



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Establecimiento de un modelo experimental para el estudio de la leishmaniosis. Estrategias de inmunización con las histonas de *Leishmania* frente a la leishmaniosis cutánea y visceral.

Memoria para optar al grado de Doctor
Presentada por: Javier Carrión Herrero

Director: Dr. Carlos Alonso Bedate

Madrid, Abril de 2007

AGRADECIMIENTOS

Mi andadura en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” se inició como objetor de conciencia en el año 1998. Después de hacer “la mili” desempeñando diversas funciones dentro del servicio de Animalario, comencé a trabajar como cuidador. Por ello, quiero expresar mi agradecimiento a D. Javier Palacín, responsable del Animalario, la primera persona que confió profesionalmente en mí para desarrollar multitud de funciones que me formaron, desde la base, dentro del mundo de la experimentación animal.

Al Dr. Carlos Alonso quiero dar mi más sincero agradecimiento por dos aspectos muy importantes en mi vida. En primer lugar por contar conmigo durante muchos años como técnico de animalario, lo que me permitió especializarme dentro del campo de la Parasitología. En segundo lugar por su dirección y apoyo científico en la realización de esta tesis doctoral y por su entrega a la hora de plantear multitud de proyectos.

Quiero dar las gracias a dos personas que se han convertido en dos de mis mejores amigos durante todos estos años, a Miguel Ángel Bordallo y a Hugo Salgado, quienes me enseñaron a trabajar con animales de laboratorio y de los que sigo aprendiendo en todos los sentidos.

Gracias a todos los compañeros con los que he coincidido en uno u otro momento en el laboratorio CX-203, Ruth, Luis, Miguel Ángel, Dani, José Manuel, Nuria, Yago, Victoria, David, Graciela, Alfonso, Nekane, Pablo y Nadia. Agradezco en especial al Dr. Salva Iborra el poder haber crecido científicamente junto a él. También agradezco al Dr. Manuel Soto sus enseñanzas para defenderme en el campo de la Biología Molecular.

A la Dra. Cristina Folgueira quiero agradecer su colaboración en los momentos más duros, eres una de las responsables de la consecución final de algunos de los clonajes. Eres la mejor compañera que he tenido y te aprecio mucho por tu sinceridad, simpatía y amistad.

Gracias al Dr. Manuel Fresno, quién hizo posible que me desintoxicara de *Leishmania* para aprender a trabajar con *Trypanosoma* a la vez que desempeñaba mis funciones de apoyo en su laboratorio. Por supuesto, gracias a todos mis compañeros del laboratorio CX-103, Virginia, Carmen & Carmen, Cristina & Cristina, Elena, Ruth, Ricardo, Nestor, Alicia, Natalia, Isabel, María Chorro, Manuel, Miguel, Gloria y Henar, con los que he compartido casi tres años de trabajo, de amistad y de jornadas de “hermandad” tan constructivas en todos los sentidos. “Nenas, ya sabéis que hay para todas...”. También agradezco al Dr. Pedro Bonay y al Dr. Miguel Iñiguez sus colaboraciones y los buenos momentos compartidos. Gracias en especial a la Dra. Nuria Gironés que me enseñó a trabajar experimentalmente con Chagas y con las tan gratificantes colaboraciones del Hospital de la Cruz Roja. Creo que todos vosotros formáis un grupo estupendo con un futuro prometedor.

Gracias a mis amigas Lara y María “la Peque” por los buenos momentos que pasamos y pasaremos juntos y por sus charlas tan constructivas. A la Dra. Ruth Risueño, que me ha ayudado en repetidas ocasiones tan desinteresadamente y me ha contagiado su buen humor. A todos aquellos que me han alegrado la existencia en cultivos, en el citómetro, biblioteca, pasillos y demás, a Aldo, Edgar, Pilar, Toñi, Maite, Ramón, Juanjo, Charo, Valentina, Conchi, Juan, Virginia, etc.

Por supuesto a mis compañeros del Departamento de Parasitología de la Universidad de Veterinaria de Cáceres, el Dr. Jesualdo Carcelén, el Dr. Carlos Gómez Nieto y a todo su equipo de investigación, con los que he compartido grandes momentos y con los que espero seguir aprendiendo. A la Dra. Virginia Iniesta, gracias por enseñarme técnicas bioquímicas de gran utilidad y por demostrarme que eres una amiga para toda la vida. Desde luego si algún equipo de investigación palpa la realidad de la leishmaniosis canina, ese es el vuestro.

A la Dra. Ana Nieto Ruiz de Zarate, gracias por tus magistrales enseñanzas bajo el microscopio, colaboraciones y aportaciones en el campo de la Anatomía Patológica.

Al Dr. José María Requena, gracias por tu honestidad, tus consejos, colaboraciones y por apostar por mi futuro inmediato.

A Magdalena Sanz, nuestra “Mada”, gracias por tu simpatía y tu saber hacer burocrático. A Reyes y a Lucía porque gracias a vuestras gestiones y complicidad he podido “comer caliente” en los peores momentos.

A todos los servicios de apoyo del Centro de Biología Molecular, en especial a todos mis compañeros pasados, presentes y futuros del Animalario, que se dejan la vida por sacar adelante un trabajo muy duro y mal reconocido.

Gracias a todos mis amigos ambientólogos, zoólogos y biólogos en general, a los que admiro por haber plantado cara a un mundo muy distinto al que nos vendieron en la Universidad. También a mis amigos de toda la vida, David y Fede. A Ralph Hunkley, Josep Capdevila, Rafa, Luis y Mario.

Dedico esta tesis a mi madre, la que me dio la vida, a la que admiro por su fuerza y coraje, por sobreponerse a la más terrible de las penas de esta injusta vida y por ser tan buena persona. Mamá, eres la mejor madre del mundo.

A toda mi familia, en especial a mi familia de Nerja, a Conchi-mi “hada madrina”, a mi abuelilla, a mi familia y amigos asturianos ¡Puxa Asturias! y a Laura-mi hermana melliza, de la que me siento muy orgulloso. Alba, sobrina, esto va también por ti.

A Lara, mi chica, mi niña, la que da sentido a mi vida, gracias por entenderme en lo bueno y en lo malo. Espero que no se lo digas a tu jefe...

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi padre, a quién un cáncer le arrancó la vida y parte de la nuestra una Nochevieja de hace muy poquitos años. No tuve tiempo de darte las gracias por ser tan constructivo, por tu buen humor y por tu constante ayuda con los estudios; gracias papá, me gustaría de corazón decirte lo orgulloso que me siento de ser tu hijo. Se que sigues estando conmigo y pelearé lo que haga falta con quien haga falta el resto de mi vida.

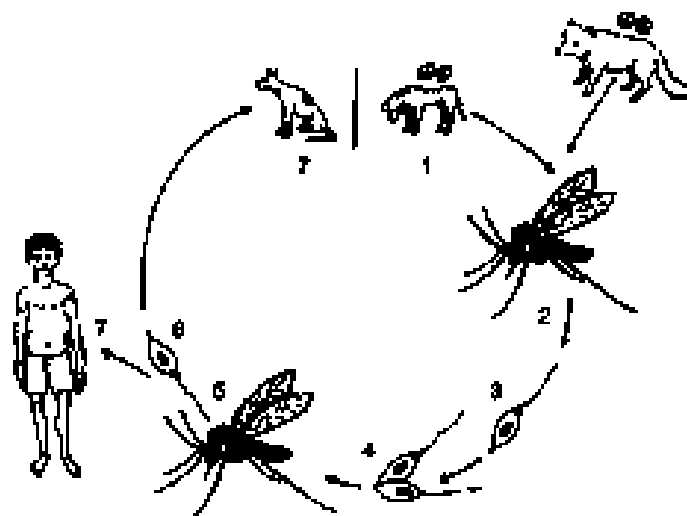
Señoras, señores ¡va por ustedes!



**“Si lloras por haber perdido el sol,
las lagrimas no te dejarán ver las
estrellas”**

Rabindranath Tagore

ÍNDICE



I. ABREVIATURAS	1
II. SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Generalidades del parásito <i>Leishmania</i>	13
1.1.1. Descubrimiento del parásito <i>Leishmania</i>	13
1.1.2. Leishmaniosis	13
1.1.3. Ciclo vital de <i>Leishmania</i>	15
1.1.4. Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i>	17
1.1.5. Leishmaniosis canina, felina y equina	17
1.1.6. Diagnóstico, control y tratamiento	18
1.2. Respuesta inmunitaria inducida por la infección con <i>Leishmania</i>	19
1.2.1. Células implicadas en la infección	19
1.2.2. Papel de las células dendríticas	20
1.2.3. Papel de las células T reguladoras (Treg)	21
1.2.4. Infección experimental con <i>Leishmania</i>	22
1.2.4.1. Dicotomía Th1/Th2	22
1.2.4.2. Modelos experimentales de LC	22
1.2.4.3. Modelos experimentales de LV	24
1.3. Búsqueda de antígenos de <i>Leishmania</i>	26
1.3.1. Estrategias de inmunización y vacunación contra <i>Leishmania</i>	26
1.3.2. Las histonas de <i>Leishmania</i>	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Medios de cultivo	39
3.1.1. Medio LB (Luria-Bertani)	39
3.1.2. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	39
3.1.3. Medio Schneider	39
3.1.4. Medio DMEM	39
3.2. Metodología molecular	39
3.2.1. Vectores de clonaje y enzimas	39
3.2.2. Técnicas de manipulación de ADN	40
3.2.2.1. Purificación y cuantificación de plásmidos recombinantes	40
3.2.2.2. Células competentes y transformación	40
3.2.2.3. PCR	40
3.2.2.4. Electroforesis de ADN	40
3.2.2.5. Secuenciación	41
3.2.3. Purificación en condiciones desnaturizantes de las proteínas recombinantes H2A, H2B, H3 y H4 fusionadas a histidinas (6xHis-tagged proteins, vector pQE) mediante cromatografía de afinidad	41

3.2.4.	Purificación de las proteínas recombinantes H2A, H2B, H3 y H4 unidas a MBP (vector pMAL) mediante cromatografía de afinidad	41
3.2.5.	Purificación de los anticuerpos anti-histonas mediante cromatografía de afinidad.	41
3.2.6.	Electroforesis y estimación de la cantidad de proteína	42
3.2.7.	Western Blot (Inmunodetección de proteínas transferidas a nitrocelulosa)	42
3.2.8.	Transfección <i>in vitro</i> de células COS7.	42
3.3.	Ensayos experimentales	43
3.3.1.	Parásitos	43
3.3.2.	Animales de experimentación	43
3.3.3.	Motivos CpG ODN y proteínas solubles de <i>Leishmania</i>	43
3.3.4.	Estrategias de vacunación con CD procedentes de médula ósea	44
3.3.4.1.	Preparación de CD	44
3.3.4.2.	Transferencia adoptiva de CD	44
3.3.5.	Ensayos de inmunización con los plásmidos recombinantes	44
3.3.6.	Ensayos de experimentación animal	45
3.3.6.1.	Infección experimental con <i>Leishmania</i>	45
3.3.6.2.	Monitorización de la infección con <i>Leishmania</i>	45
3.3.6.3.	Extracciones de sangre, sacrificios y necropsias	45
3.3.7.	Determinación del valor hematocrito	46
3.3.8.	Determinación de la carga parasitaria	46
3.3.9.	Ensayos de ELISA	46
3.3.9.1.	Respuesta humoral	46
3.3.9.2.	Determinación de citoquinas	47
3.3.10.	Citometría de flujo	47
3.3.10.1.	Células productoras de IFN- γ ó IL-4 y células Treg	48
3.3.10.2.	Moléculas coestimuladoras (CD80 ⁺ , CD86 ⁺) en células CD11c ⁺ de DLN	48
3.3.11.	Determinación de nitritos y de la actividad arginasa	48
3.3.12.	Ensayos de proliferación celular	49
3.3.13.	Estudio histopatológico	49
3.3.14.	Análisis estadísticos	50
4.	RESULTADOS	51
4.1.	Modelo experimental BALB/c de LV. Estudio de las características inmunohistológicas inducidas por la infección con <i>L. infantum</i>	53
4.1.1.	Características clínicas de los ratones infectados con <i>L. infantum</i>	53
4.1.2.	Detección parasitaria	54
4.1.3.	Respuesta humoral contra <i>Leishmania</i>	55
4.1.4.	Producción de citoquinas	55
4.1.5.	Fenotipo de las células esplénicas. Citometría de flujo	56
4.1.6.	Estudio histológico de la infección visceral en ratones BALB/c	57

4.2. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LC	60
4.2.1. Progresión de las lesiones después de la primera infección	61
4.2.2. Control a largo plazo de la reinfección cutánea	61
4.2.3. El control frente a la infección por <i>L. major</i> se correlaciona con la inducción de una respuesta Th1 específica y una restricción de la respuesta Th2 específica	62
4.2.4. Respuesta humoral	64
4.2.5. Actividad arginasa	65
4.2.6. Estudio histológico y aspecto de las lesiones	66
4.3. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LV	68
4.3.1. Determinación de las cargas parasitarias	69
4.3.2. Atenuación de la respuesta de susceptibilidad frente a LV	69
4.4. Obtención de las proteínas recombinantes y de las construcciones genéticas realizadas con las histonas de <i>Leishmania</i>	70
4.4.1. Purificación de las proteínas recombinantes histonas de <i>Leishmania</i>	70
4.4.2. Construcción de los plásmidos recombinantes	71
4.4.3. Expresión de las construcciones genéticas en células COS7	72
4.5. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LC	73
4.5.1. Progresión de las lesiones y de las cargas parasitarias después de la primera infección	74
4.5.2. Inducción de dos tipos de perfiles inmunitarios de resistencia	75
4.6. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LV	77
4.6.1. Determinación de las cargas parasitarias	77
4.6.2. Incapacidad para suscitar una respuesta inmunitaria capaz de controlar la infección visceral	77
5. DISCUSIÓN	79
5.1. Modelo experimental BALB/c de LV. Estudio de las características inmunohistológicas inducidas por la infección con <i>L. infantum</i>	81
5.2. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LC	83
5.3. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LV	85
5.4. Construcciones genéticas de las histonas	85
5.4.1. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LC	86
5.4.2. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LV	86

5.5. Ventajas de la inmunización genética multicomponente. Progresión de la leishmaniosis	87
5.6. Esterilidad <i>versus</i> persistencia parasitaria. Curación o memoria inmunitaria	87
5.7. Ventajas e inconvenientes de la inmunización genética y de la vacunación con CD en el contexto de las histonas. Perspectivas de futuro	88
6. CONCLUSIONES	91
7. BIBLIOGRAFÍA	95
8. ANEXO. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	111

ABREVIATURAS



I. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.
Ag: antígeno
ALT: alanino aminotransferasa.
APC: células presentadoras de antígeno (del inglés *Antigen Presenting Cells*).
AST: aspartato aminotransferasa.
BCG: bacilo de Calmette y Guérin.
BMDC: CD derivadas de médula ósea.
BSA: albúmina de suero bovino.
°C: grados centígrados.
CBMSO: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CD: células dendríticas.
Ci: curios.
col.: colaboradores.
ConA: concanavalina A.
CpG: oligodeoxinucleótidos ricos en citosina y guanina.
cpm: cuentas por minuto.
Cy: Cy-Chrome™.
DLN: ganglios linfáticos drenantes (del inglés *Draining lymph node*).
DMEM: medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
DMSO: dimetil-sulfóxido.
EDTA: ácido etilendiaminotetracético.
ELISA: del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.
FCS: suero fetal bovino (del inglés *Fetal Calf Serum*).
Fig.: figura.
FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
FML: ligando fucosa manosa.
Foxp3: factor de transcripción (del inglés *Forkhead box protein 3*)
g: aceleración de la gravedad.
GM-CSF: factor de diferenciación de CD (del inglés *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*).
h: hora.
HIS: mezcla de histonas.
HSP: proteína de choque térmico (del inglés *Heat Shock Protein*).
H&E: hematoxilina y eosina.
IFI: inmunofluorescencia indirecta.
IFN- γ : interferón gamma.
Ig: inmunoglobulina.
iNOS: enzima óxido nítrico-sintasa.
IL: interleuquina.
IPTG: iso-propil-tiogalactósido.
Kb: kilobases.
KDa: kilodalton.
LB: medio de cultivo Luria-Bertani.
LC: leishmaniosis cutánea.
LCD: leishmaniosis cutánea difusa.
LDPK: leishmaniosis dérmica post *kala azar*.
Lm: Ag de *Leishmania major*.
LMC: leishmaniosis mucocutánea.

LPG: lipofosfoglicano.
 LPS: lipopolisacárido.
 LV: leishmaniosis visceral.
 M: molar.
 MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
 mg: miligramos.
 min.: minutos.
 ml: mililitros.
 mm.: milímetros.
 mM: milimolar.
 µg: microgramos.
 µl: microlitros.
 µM: micromolar.
 µm: micrómetros.
 ng: nanogramos.
 NK: células asesinas (del inglés *Natural Killer*).
 nm: nanómetros.
 NO: óxido nítrico.
 nt: nucleótidos.
 OMS: Organización Mundial de la Salud.
 OPD: ortofenilenediamina.
 PAGE-SDS: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
 PAMP: patrones moleculares patogénicos (del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*).
 p/v: peso/volumen.
 PALS: vaina linfóide periarteriolar (del inglés *Periarteriolar Lymphoid Sheath*).
 pb: pares de bases.
 PBS: tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffer Saline*).
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*).
 PE: Ficoeritrina.
 p. i. : post-infección
 PMN: células polimorfo-nucleares.
 PMSF: fenil-metil-sulfonil fluoruro.
 PRR: receptores de reconocimiento (del inglés *Pattern Recognition Receptors*).
 PT: proteína total.
 rpm: revoluciones por minuto.
 RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute.
 SDS: dodecil sulfato sódico (del inglés *Sodium Dodecil Sulfate*).
 seg.: segundos.
 SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
 SLA: antígeno soluble de *Leishmania* (del inglés *Soluble Leishmania Antigen*).
 SPMC: células mononucleares esplénicas (del inglés *Spleen Mononuclear Cells*)
 t: tiempo.
 T: temperatura.
 TAE: Tris-Acético-EDTA.
 Th: linfocitos T colaboradores (del inglés *helper*).
 TLR: receptor celular (del inglés *Toll Like Receptor*).
 Treg: linfocitos T supresores/reguladores
 U: unidades.
 UV: ultravioleta.

V: voltios.

V/h: voltios/hora.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

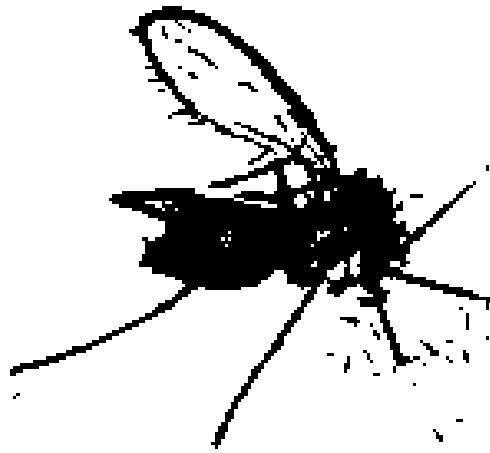
v/v: volumen/volumen.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

ZM: zona marginal esplénica.

Los términos ingleses sin clara traducción al castellano y de frecuente utilización en Biología Molecular se han escrito en cursiva.

SUMMARY



II. SUMMARY

Leishmaniasis refers to a wide range of vector-borne diseases caused by intracellular protozoa parasites of the genus *Leishmania*. These zoonotic diseases are a major public health problem in many countries. Several experimental animal models of leishmaniasis have been developed over the years. However, the level of protection provided by vaccines against visceral leishmaniasis (VL) is low, probably due to the lack of appropriate models to study both the disease and the protective immunity. We have analysed the immunohistological features occurring in BALB/c mice after intravenous administration of 10^3 , 10^5 and 10^6 parasites of *Leishmania infantum*. We found, that in mice, the development of some quantifiable immunohistological features was dependent on the inoculum size: level of anti-*Leishmania* antibodies, up-regulation of spleen arginase activity, balance between IFN- γ and IL-10, lymphoid follicle depletion in the splenic white pulp and the development of hepatic granulomas. Our results suggested that a challenge of mice with 10^5 parasites should prove useful for the study of the level of protection induced by vaccines against VL.

The mechanisms underlying the protective effects induced by dendritic cells (DC)-based vaccines against leishmaniasis in mice are not yet completely understood. In the present study, we investigated the potential of DC loaded with a mixture of the *L. infantum* histones in the absence (HIS-pulsed DC) or presence of CpG motifs (HISCpG-pulsed DC) against cutaneous (CL) and visceral leishmaniasis (VL). Our data showed that a single intravenous administration of HIS-pulsed DC or HISCpG-pulsed DC confers control to *L. major* infection in BALB/c mice. All HIS-pulsed DC vaccinated mice were able to control the primary infection but remained susceptible to a second challenge. Interestingly, HISCpG-pulsed DC vaccinated mice were able to control the *L. major* reinfection. The antileishmanial immunological mechanisms of protection were dependent on the ability to induce a Th1 response, a restriction of Th2 and a low frequency of Foxp3⁺ regulatory T-cells at the site of infection. These results document that a vaccine based on a HISCpG-pulsed DC formulation may prove to be a new and further tool to add to those designed to protect against *L. major* infection. Also, we found that the use of HIS- or HISCpG-pulsed DC partially restricts the splenic and hepatic parasite burdens in the 50 % of mice upon challenge with *L. infantum* parasites.

We cloned the nucleosomal histones of *L. infantum* into the mammalian expression vector pcDNA3 in order to generate the following clones pcDNA3-H2AH3JC, pcDNA3-H2BH4JC, pcDNA3-H2AH4JC and pcDNA3-H2BH3JC. The clones were expressed well in mammalian cells. Finally, we studied the immune response induced by double DNA plasmids against murine CL or VL. A delayed footpad swelling and a restriction in the parasite growth in the DLN were observed in the inoculated mice after 6 weeks of infection with *L. major* parasites. We think that the high accumulation of splenic Treg cells may explain the attenuation of the Th2 response, but also of the Th1 response. However, similar genetic immunization in mice did not result in control of *L. infantum* challenge.

Finally, we discuss various strategies to prevent or treat leishmaniasis for the optimization of the use of DC and of the histones of *Leishmania* for vaccine development.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del parásito *Leishmania*

1.1.1. Descubrimiento del parásito *Leishmania*

El hallazgo del parásito *Leishmania* tuvo lugar de forma simultánea aunque independiente en 1903 por parte de sir William Boog Leishman, bacteriólogo escocés perteneciente al servicio médico del ejército británico y de Charles Donovan, del servicio médico indio, tras analizar los bazos de pacientes que sufrían de una enfermedad parecida a la malaria. Esta enfermedad, entonces conocida como kala-azar o fiebre dum-dum, pasaría a denominarse LV (Awasthi & col., 2004). Previamente, en el año 1900, William Leishman ya había desarrollado una modificación del contraste de Romanowsky que le permitió detectar al parásito causante del kala-azar en sangre del interior del tubo digestivo de los flebótomos. El parásito fue denominado *Leishmania* por sir Ronald Ross y más tarde pasaría a conocerse entre la comunidad científica como *Leishmania donovani*, agente causal de la LV. El doctor William Leishman centró su actividad investigadora tanto en el estudio de la leishmaniosis como en el perfeccionamiento de la vacuna contra la fiebre tifoidea. Una vacunación masiva de soldados británicos durante la primera guerra mundial en 1914, evitó que el número de muertos por tifus fuese mayor. Leishman falleció en 1926 a los sesenta y un años. Uno de sus colegas le dedicó el siguiente epitafio “sabía convertir a los rivales en amigos y a los amigos en hermanos” (Lima-Netto, 1999).

1.1.2. Leishmaniosis

Las leishmaniosis constituyen un amplio grupo de enfermedades causadas por parásitos protozoos intracelulares del género *Leishmania*, con cuadros clínicos y epidemiológicos diversos. Estos parásitos son transmitidos por un insecto díptero perteneciente a la familia *Psychodidae* que actúa como vector y cuyo género varía en función del área geográfica considerada como veremos más adelante. En general, cuando se hace referencia al vector de transmisión de *Leishmania* se habla de flebótomo. Las leishmaniosis humanas están distribuidas por todo el mundo y según datos procedentes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia de la enfermedad es de 12 millones de casos y actualmente amenaza a 350 millones de personas en 88 países diferentes, principalmente en zonas tropicales y subtropicales (<http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.htm>).

Entre los factores determinantes del control de la enfermedad están la virulencia de la especie de *Leishmania* implicada, así como el nivel de inmunocompetencia y predisposición genética del hospedador (Alexander & col., 1999). Las especies del género *Leishmania* son patógenos eucariotas que han coevolucionado con el sistema inmunitario del hospedador vertebrado estableciéndose por lo general infecciones de tipo crónico. Atendiendo a los síntomas clínicos de la enfermedad, las leishmaniosis han sido clasificadas en 4 tipos: LV, LC, cutáneo-difusa (LCD) y muco-cutánea (LMC).

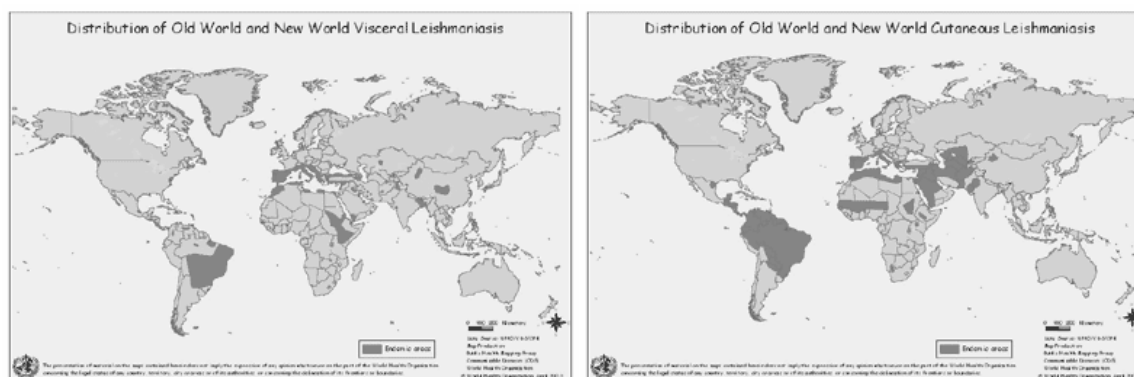


Figura 1. Distribución geográfica de las especies de *Leishmania* causantes de LV y de LC. Datos procedentes de la OMS.

<http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.htm>

LV: En el subcontinente Indio, Asia y África, la LV (Fig. 1) está causada por *L. donovani*, mientras que *L. infantum* y *L. chagasi* son los agentes causales de la LV en la región Mediterránea y sudeste y centro de Asia y Sudamérica (sobre todo en niños). Otras especies como *L. tropica* y *L. amazonensis* son ocasionalmente viscerotrópicas.

Entre la población humana sana, con baja susceptibilidad a la infección visceral, las infecciones asintomáticas y subclínicas son comunes. En cambio, en niños que todavía no han alcanzado un adecuado nivel de inmunocompetencia o en adultos con malnutrición o inmunosupresión por estar coinfectados con VIH, las infecciones se manifiestan de forma oligosintomática o activa. En este último caso las manifestaciones clínicas, que aparecen normalmente a los 3 meses, se expresan con fiebre, debilidad, anorexia, sudor nocturno, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, incluso en ocasiones poco frecuentes hay un oscurecimiento de la piel por hiperpigmentación (por ello la denominación de *kala-azar*, fiebre negra en Hindi). También son características la anemia, leucopenia o trombocitopenia, hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia policlonal (anticuerpos IgG e IgM). Entre las manifestaciones tardías, si no se recibe tratamiento, están la caquexia, glomerulonefritis (ocasionada por el depósito de inmunocomplejos), sangrado, incluso fallo multisistémico y finalmente la muerte (Murray & col., 2005)). Tras un tratamiento exitoso un 3-10% de los casos desarrollan una **leishmaniosis dérmica post kala-azar (LDPK)** que suele auto-curar sin necesidad de tratamiento, con aparición de nódulos en la superficie de los miembros y la cara. La LDPK suele derivar de infecciones por *L. donovani* en África y la India (Carvalho & col., 1992). Puede haber casos de reactivación de la infección en situaciones de inmunosupresión en pacientes con VIH (Murray & col., 2005).

El vector en el Nuevo Mundo es *Lutzomyia longipalpis*, pero en el Viejo Mundo están implicadas especies pertenecientes al género *Phlebotomus* (*P. perniciosus*, *P. ariasi*). El perro es el reservorio principal, aunque también pueden ser reservorios el zorro, el chacal y el lobo (Gramiccia & Gradoni, 2005).

LC: El principal foco de LC se encuentra en África, Asia y la mayoría de América Latina. Las especies de *Leishmania* implicadas en el Viejo Mundo son *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y la especie dermatrópica *L. infantum*. Las especies causantes de LC en el Nuevo Mundo (Fig. 1) son *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naifii*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. shawi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* y la especie dermatrópica *L. infantum*.

En humanos las LC suelen auto-curar aunque en ocasiones requieren tratamiento. Los síntomas clínicos de la enfermedad, tras un periodo de incubación de 2 a 6 semanas, se manifiestan como lesiones nódulo-ulcerativas en zonas expuestas de la piel (Gramiccia & Gradoni, 2005). También pueden aparecer linfadenopatías y pueden darse casos de recidivas después de 1 a 5 años de la curación. Aunque es muy poco frecuente, la LC puede derivar bien hacia la forma **LCD** descrita en Latinoamérica y Etiopía, con múltiples nódulos no ulcerativos en la piel, bien hacia la **forma LMC o espundia** causada principalmente por *L. braziliensis* en Latinoamérica con ulceraciones de las mucosas orales y nasofaríngeas que producen desfiguraciones (Murray & col., 2005).

En su mayoría, las especies de *Leishmania* del Viejo Mundo están distribuidas por vectores del género *Phlebotomus* (principalmente *P. papatasi*), mientras que las especies del Nuevo Mundo están distribuidas por vectores del género *Lutzomyia*. Entre los reservorios existen diversas especies de roedores, ardillas, monos, coatís e incluso gatos domésticos en el caso de *L. venezuelensis* (Bonfante-Garrido & col., 1991).

1.1.3. Ciclo vital de *Leishmania*



Figura 2. Lesiones en pacientes con diversos tipos de leishmaniosis. Hepatoesplenomegalia de un paciente con LV (A). Paciente que ha desarrollado LDPK (B). Lesión ulcerosa de una paciente con LC (C). Caso de un paciente con recidiva cutánea (D). Aspecto facial de la LCD (E). Desfiguraciones causadas por la LMC (F). <http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.htm>

Los parásitos del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida dimórfico (Fig. 3) que implica a los vectores flebótomos y a los hospedadores vertebrados (Alexander & Russell, 1992; Handman, 1999). En estos últimos, *Leishmania* se encuentra en forma de cuerpos esféricos sin capacidad de movimiento y con un diámetro de entre 2,5 a 5 μm , la fase amastigote. En la transmisión de uno a otro hospedador vertebrado es necesaria la mediación del vector, un díptero perteneciente al género *Phlebotomus* en el “Viejo Mundo” o del género *Lutzomyia* en el “Nuevo Mundo”. A diferencia del macho, la hembra flebótomo es

hematófaga y la responsable de la transmisión de *Leishmania* al ingerir macrófagos infectados con amastigotes junto con la sangre del hospedador del cual se alimenta.

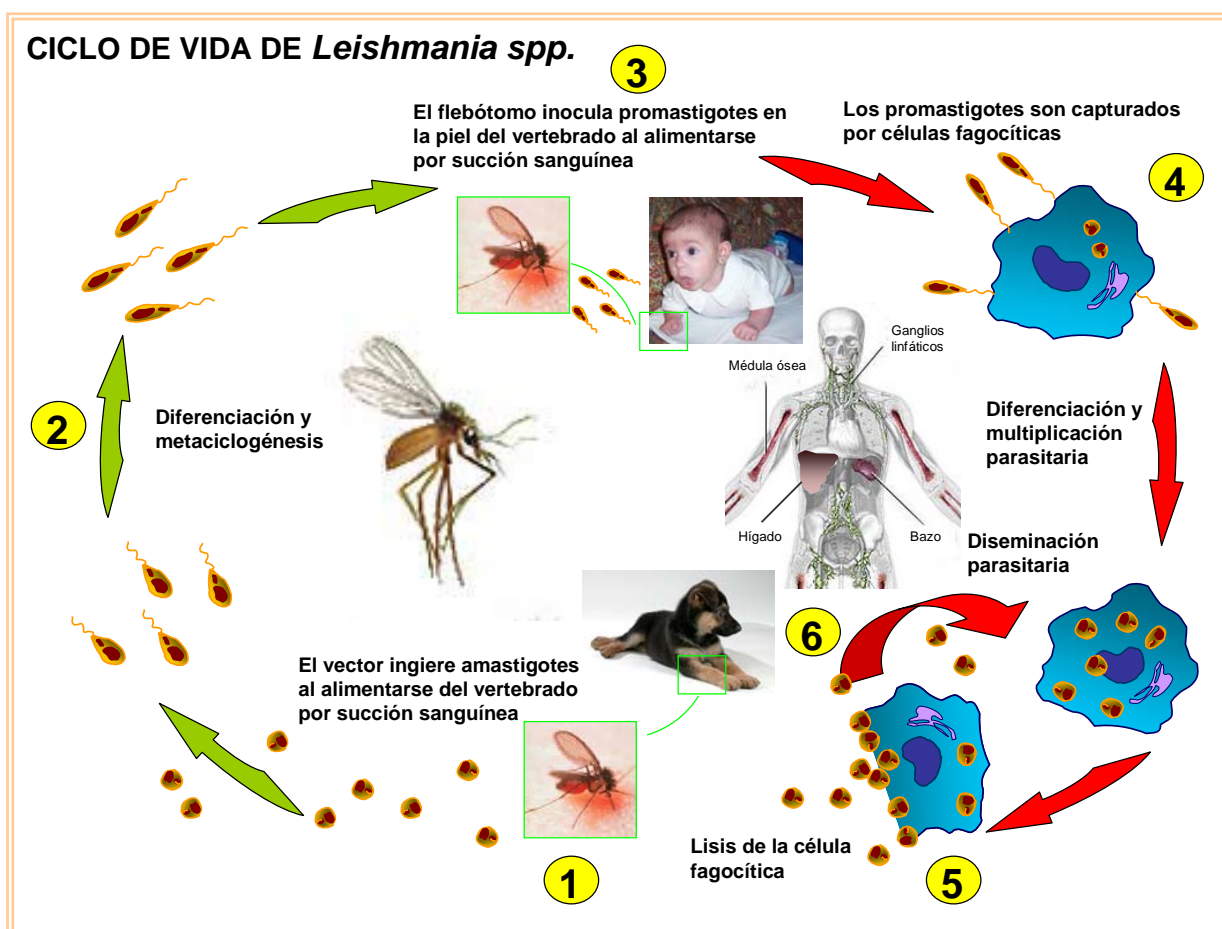


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*.

Los amastigotes son liberados en el tubo digestivo medio del díptero, donde se diferencian inmediatamente en otra fase parasitaria, promastigotes procíclicos, formas flageladas no infectivas y con capacidad de división que se unen al epitelio digestivo impidiendo ser excretados. *Leishmania* es capaz de sobrevivir dentro del tubo digestivo del vector gracias a que la diferenciación a promastigote procíclico implica un aumento de la expresión en superficie de grandes cantidades de LPG así como de otros glicoconjugados como la metaloproteasa gp63. Este mecanismo confiere al parásito una alta protección frente al ambiente hostil generado dentro del tubo digestivo del flebótomo por la liberación de enzimas hidrolíticas (Alexander & col., 1999). A través de un proceso denominado metaciclogénesis (Sacks, 1989) los promastigotes procíclicos pierden la capacidad de división y adquieren virulencia transformándose en promastigotes metacíclicos, que se separan del epitelio digestivo y migran hacia la cavidad buco-faríngea. De esta forma, en el siguiente proceso de alimentación por succión sanguínea, el flebótomo hembra liberará los promastigotes metacíclicos junto con su saliva dentro de un hospedador vertebrado (Sacks & Kamhawi, 2001). Dentro del hospedador los promastigotes metacíclicos usan diversos mecanismos de evasión frente a las defensas inmunitarias para lograr introducirse en los macrófagos y en otras células fagocíticas. Una vez dentro del macrófago, los promastigotes

son incorporados a los fago-lisomas y revierten a la forma amastigote. La multiplicación de los amastigotes produce la lisis del macrófago, de forma que los parásitos son liberados para continuar el ciclo infectando a otros macrófagos (Cunningham, 2002). Finalmente todos los órganos que contienen macrófagos y otras células fagocíticas son infectados, especialmente el bazo, el hígado y la médula ósea.

1.1.4. Clasificación taxonómica de *Leishmania*

Una reciente clasificación taxonómica de los parásitos del género *Leishmania* (Cavalier-Smith, 2004; Moreira & col., 2004) se presenta en la siguiente tabla.

Reino Protozoa (Goldfuss, 1818) Subreino Biciliata (Cavalier-Smith, 2003) Phylum: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981) Clase: Kinetoplastea (Honigberg, 1963) Subclase: Metakinetoplastina (Moreira, 2004) Orden: Trypanosomatida (Kent, 1880; Hollande, 1952) Género: <i>Leishmania</i> (Ross, 1903) Subgénero: <i>Leishmania</i> (Ross, 1903), presente en el Nuevo y Viejo Mundo. Subgénero: <i>Viannia</i> (Lainson y Shaw, 1987), presente en el Nuevo Mundo.
--

El orden de los tripanosomátidos presenta un origen evolutivo común hace 500 millones de años y se caracterizan por tener un flagelo y un kinetoplasto (Maslov & col., 2001). Sin embargo, el origen del género *Leishmania* parece ser diferente según el subgénero considerado. De hecho, se ha propuesto que el subgénero *Viannia* haya tenido su origen en el Nuevo Mundo, mientras que el subgénero *Leishmania* haya surgido en África, pero que posteriormente haya sido introducido repetidamente en el Nuevo Mundo (Momen & Cupolillo, 2000).

1.1.5. Leishmaniosis canina, felina y equina

El perro doméstico está considerado como el principal reservorio de *L. infantum* en la región mediterránea, jugando un papel clave en la transmisión del parásito a seres humanos a través del flebótomo. La prevalencia de la enfermedad activa es menor que la de las infecciones subclínicas. Así, menos del 50% de los perros infectados desarrollan caquexia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, onicogrifosis y pancitopenia (Cabral & col., 1998; Solano-Gallego & col., 2001). El tratamiento antileishmanial suele ser caro e ineficaz (Ashford, 1996), por lo que la vacunación puede ser una buena alternativa para disminuir la carga parasitaria en perros (Gradoni, 2001). Los apartados de tratamiento y de estrategias de vacunación contra *Leishmania* se detallan más adelante.

Aunque son poco frecuentes, también se han descrito recientemente casos de leishmaniosis en gatos y en especies equinas en varios países mediterráneos así como en otros sudamericanos. Los casos de leishmaniosis felina (Martin-Sanchez & col., 2006) son de tipo cutáneo principalmente, aunque también hay algunos de tipo sistémico. En ensayos experimentales se había observado cierto grado de resistencia natural en los gatos frente a la infección por *Leishmania*, sin embargo datos procedentes de infecciones naturales han puesto de manifiesto que es necesario un tratamiento antileishmanial para lograr la recuperación de la enfermedad. Incluso se han descrito varios casos de coinfección con virus inmunodepresores

que facilitan la diseminación parasitaria, constituyendo el gato otro posible hospedador reservorio (Gradoni, 2001; Gramiccia & Gradoni, 2005).

En cuanto a la leishmaniosis equina, en todos los casos de infección por *Leishmania* que se han descrito en diversas especies domésticas (burros, caballos y mulas), se ha observado una sintomatología cutánea sin visceralización que progresa hacia la autocuración sin necesidad de tratamiento. Esto se debe a que las especies equinas desarrollan respuestas inmunitarias de tipo resistente (Gramiccia & Gradoni, 2005).

1.1.6. Diagnóstico, control y tratamiento

Existen varios métodos de diagnóstico de la leishmaniosis. Los métodos más empleados son el proteinograma junto con análisis bioquímicos y hematológicos a partir de muestras de sangre y orina. Se consideran como positivos aquellos casos que presentan hiperproteinemia e hipergammaglobulinemia policlonal, anemia no regenerativa y trombocitopenia. Cuando la enfermedad cursa con lesiones renales se detectan elevados niveles de urea y creatinina, mientras que si aparecen lesiones hepáticas, suele detectarse una disminución importante en la concentración de la albúmina en plasma por un lado y, por otro, un incremento de los niveles enzimáticos en sangre de las aminotransferasas ALT y AST.

La práctica de métodos serológicos como la IFI o el test de ELISA, es también habitual para detectar unos títulos altos de IgG antileishmaniales en suero. Los métodos más fiables de diagnóstico son la biopsia de la piel, la punción de médula ósea o de ganglio linfático y las improntas de tejido infectado para detectar a nivel microscópico la presencia de parásitos, sin embargo conllevan cierto riesgo en personas o animales debilitados por la propia enfermedad (Sundar & Benjamin, 2003; Vega-Lopez, 2003). Por esa razón, estos métodos solo se aplican como alternativas cuando el resto de técnicas de diagnóstico no son suficientemente concluyentes (Ferrer & col., 1995). Las técnicas de cultivo parasitario y la detección del ADN del parásito mediante PCR aún no pueden llevarse a cabo en la mayoría de los laboratorios de países en desarrollo (de Oliveira & col., 2003; Fissore & col., 2004; Oliveira & col., 2005). El epítipo K39 se ha empleado para diagnóstico al ser reconocido por anticuerpos IgG anti-K39 de los sueros de pacientes con LV. Se trata de un patoantígeno de la molécula kinesina que sólo se expresa en la fase amastigote de las especies viscerales de *Leishmania* (Chang & col., 2003). En nuestro laboratorio se desarrolló una proteína quimera PQ de gran utilidad en diagnóstico ya que es reconocida por anticuerpos específicos de sueros de perros leishmaniósicos. Contiene cinco determinantes antigénicos de las proteínas de LiP2a, LiP2b, H2A y P0 de *Leishmania infantum*. Algunos de ellos están implicados en la formación de inmunocomplejos previos a las manifestaciones patológicas, lo que les confiere además un inestimable valor como marcadores de patología (Soto & col., 1998).

Los métodos para controlar la transmisión de la enfermedad están dirigidos tanto hacia el control del vector como del reservorio (Murray & col., 2005). En los primeros se lleva a cabo la identificación de zonas endémicas donde se distribuye el flebótomo para establecer campañas de fumigación y uso de repelentes. En los métodos de control del reservorio es esencial la detección de perros u otras especies de cánidos que padecen la enfermedad para iniciar su tratamiento o su eutanasia evitando así que puedan ser focos de contagio para otros animales y personas. No hay que olvidar que unos métodos de control adecuados contra la diseminación de la leishmaniosis deben contemplar no sólo el desarrollo de técnicas de detección y el uso de fármacos eficientes, sino también el diseño de vacunas de aplicación humana y veterinaria (ver más adelante en el apartado de estrategias de vacunación). También

es fundamental conocer el genoma del parásito para desarrollar nuevos medicamentos que permitan identificar dianas a las que dirigir la acción terapéutica.

El tratamiento quimioterapéutico, en concreto la terapia con compuestos antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®), puede acelerar la curación, disminuir el tamaño de las cicatrices y prevenir posibles recaídas en pacientes con LC. Estos compuestos interfieren con las rutas metabólicas del parásito. Sin embargo, dependiendo de la especie de *Leishmania* implicada en LC, la mayoría de las lesiones cutáneas auto-curan entre 2 y 15 meses. En el caso de la LV, la terapia antimonial es la más ampliamente utilizada y alcanza una tasa de curación clínica del 90%. Pero el uso de compuestos antimoniales no está exento de efectos secundarios. En la actualidad la anfotericina B ha demostrado que tiene una alta eficacia, y sus efectos adversos pueden evitarse mediante su administración en liposomas, sin embargo su elevado coste limita su empleo en países en desarrollo (Barratt & Legrand, 2005; Sundar & Rai, 2005). El tratamiento oral con miltefosina es el más efectivo contra la LV, pero genera reacciones gastrointestinales adversas. Algunos investigadores han sugerido emplear tratamientos combinados en los que un segundo agente consiga mantener el efecto de la miltefosina (Bhattacharya & col., 2004).

A diferencia de la LV humana, que puede ser curada completamente en muchos casos, no sucede lo mismo con la leishmaniosis canina, debido a la alta susceptibilidad del sistema inmunológico de la mayoría de los perros y a que se recurre a la terapia cuando el animal se encuentra en una fase muy avanzada de infección y enfermedad. La eficacia del tratamiento en humanos es elevada, con un 90% de pacientes que se curan tanto a nivel clínico como a nivel de infección. Una de las razones de esta alta tasa de curación se debe a que el diagnóstico suele hacerse cuando la enfermedad todavía está en fases tempranas. El sistema inmunológico de los seres humanos está bien preparado para luchar contra los parásitos de *Leishmania*, no así en el caso de niños, personas de edad avanzada o personas inmunodeprimidas por infección con VIH. Los pacientes coinfectados con VIH presentan unos niveles bajos de linfocitos TCD4⁺ que complica la respuesta al tratamiento quimioterapéutico y favorece posibles recaídas (Cruz & col., 2006; Ramos & col., 1998).

1.2. Respuesta inmunitaria inducida por la infección con *Leishmania*

1.2.1. Células implicadas en la infección

Los componentes de la saliva del vector ejercen en el hospedador un efecto vasodilatador, anticoagulante, inmunomodulador y quimioatrayente de células inmunitarias. Esto induce un reclutamiento hacia el sitio de infección de células PMN, macrófagos, y posteriormente de células NK y de CD. La respuesta inmunitaria innata se inicia después de que estas células inmunitarias equipadas con receptores de reconocimiento PRR como los TLR y otros receptores fagocíticos, hayan contactado con *Leishmania* y reconocido sus PAMP así como otras moléculas leishmaniales conservadas. Las primeras células reclutadas hacia el sitio de infección por *Leishmania* son las células PMN, en concreto los granulocitos neutrófilos, cuya función principal implica la fagocitosis y la eliminación de patógenos en respuestas inmunitarias innatas (Lima & col., 1998). Los granulocitos pueden liberar citoquinas proinflamatorias que atraen CD y su interacción a través del receptor específico DC-SIGN (se une con glicanos específicos de los neutrófilos) orquesta respuestas inmunitarias de tipo Th1 (van Gisbergen & col., 2005). Sin embargo, estudios recientes describen que las células PMN pueden tener funciones contradictorias dependiendo de la expresión en superficie de CD28 (Awasthi & col., 2004). Tras ser ingeridos por los granulocitos PMN, los parásitos de *Leishmania* inducen la liberación de MIP-1 β e IL-8 con

efecto quimioatrayente de macrófagos y más PMN al sitio de infección. Si los PMN son CD28⁺ interactúan con los macrófagos a través de los receptores CD80/86, induciendo la síntesis de IFN- γ que aumenta en los granulocitos PMN la expresión en superficie de moléculas MHC-II. Así los PMN funcionan como APC para iniciar una respuesta inmunitaria de células T contra *Leishmania* (Awasthi & col., 2004). Sin embargo, si los PMN infectados son CD28⁻ llegan a ser células apoptóticas que exponen en superficie residuos de fosfatidil serina y son fagocitados por macrófagos, lo cual constituye una estrategia de **entrada “silenciosa”** usada por *Leishmania* para entrar en los macrófagos sin activar sus defensas antimicrobianas (Teixeira & col., 2006; van Zandbergen & col., 2004). Sorprendentemente, dependiendo de la especie implicada, los neutrófilos pueden servir bien como células hospedadoras donde sobreviven los parásitos de *L. major* durante los primeros días de infección (Laufs & col., 2002), bien como células fagocíticas leishmanicidas durante la fase temprana por la infección con *L. infantum* (Rousseau & col., 2001).

Por otro lado, macrófagos reclutados y activados pueden fagocitar *Leishmania* y liberar diversos quimio-atrayentes (CCL2, CXCL10, MIP-1 α , MIP-1 β y CCL5) de CD, macrófagos, células NK y monocitos. Normalmente los parásitos son opsonizados por el factor del complemento C3b y así son reconocidos por el receptor CR1 de los macrófagos, pero la gp63 acelera la conversión de C3b a su forma inactiva C3bi facilitando la **invasión silenciosa** del macrófago a través del receptor CR3. Otros posibles receptores de entrada en los macrófagos son los TLR del macrófago, el CR4, el receptor Fc, el receptor de manosa-fucosa o el receptor de fibronectina, que también facilitan la entrada a células de Langerhans epidérmicas. Finalmente, los parásitos y las partículas opsonizadas son ingeridas por las células fagocíticas (Gordon, 2002; Muzio & col., 2000; Ross, 2000). Además de granulocitos y macrófagos, los parásitos de *Leishmania* también infectan CD (Scott & Hunter, 2002).

Existen otras estrategias, aparte de las que se acaban mencionar, que permiten a *Leishmania* evitar de forma exitosa las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas del hospedador. Así, los parásitos metacíclicos expresan en superficie una cantidad todavía mayor de moléculas de LPG, gp63 y de proteínas kinasas leishmaniales que inhiben la lisis mediada por complemento, bien al impedir la unión del complejo de ataque a membrana C5-C9 a la superficie parasitaria, bien al fosforilar C3, C5 y C9. Después de unirse a la superficie del macrófago los promastigotes son endocitados en un fago-lisosoma, pero sus moléculas de LPG los protegen de las condiciones hidrolíticas del interior (Descoteaux & col., 1995) y disminuyen la capacidad migratoria de los macrófagos desde el sitio de infección. Por otro lado, los parásitos inducen la síntesis de citoquinas (TGF- β e IL-10) que favorecen la persistencia parasitaria en macrófagos, cuya actividad leishmanicida también queda suprimida por la acción del maxadilán, un componente peptídico contenido en la saliva del vector (Alexander & col., 1999; Hall & Titus, 1995).

1.2.2. Papel de las células dendríticas

Estudios recientes describen la presencia de parásitos de *Leishmania* en CD de hospedadores infectados (Scott & Hunter, 2002). Las CD cumplen un papel esencial como APC siendo un nexo entre las respuestas inmunitarias innatas y las adquiridas. Las células precursoras de CD se producen en la médula ósea y circulan hacia los tejidos donde residen como células inmaduras con una alta capacidad fagocítica (Banchereau & col., 2000). Durante el contacto con *Leishmania*, las CD inmaduras interactúan a través de sus receptores PRR con diversos antígenos leishmaniales que son reconocidos como PAMP. Incluso se han descrito reconocimientos de complejos antígeno-anticuerpo (Pulendran, 2004). Hay que tener

en cuenta posibles reconocimientos diferenciales entre distintas formas y especies de *Leishmania*. De hecho los receptores específicos de las CD (DC-SIGN) no reconocen promastigotes de *Leishmania major* (Colmenares & col., 2004). Además, hay que tener en cuenta la variabilidad de respuesta funcional según el subtipo de población de CD considerado (Moreno, 2007). Después de la interacción entre los parásitos y las CD, éstas sufren un proceso de maduración durante el cual aumentan la expresión en superficie de MHC de tipo I y II, así como de moléculas coestimuladoras (CD40, CD54, CD80 y CD86). De forma simultánea, en el establecimiento de respuestas inmunitarias protectoras frente a *L. major*, las CD infectadas son capaces de sintetizar IL-12 (a diferencia de los macrófagos), que conduce a la generación de un perfil de tipo Th1 (von Stebut & Udey, 2004), y además las CD transportan los parásitos hacia los DLN y hacia el bazo, donde establecen sinapsis inmunológicas con los respectivos ligandos de los linfocitos T. De esta forma se produce una activación de células T mediante las interacciones CD40-CD40L y CD80/86-CD28, mientras que la interacción CD80/86-CTLA-4 conduce a la falta de activación. Dependiendo del tipo de sinapsis que se establezcan se promueven unos u otros fenotipos *Leishmania*-específicos de tipo Th1/Th2 (TCD4⁺), citotóxico (TCD8⁺) o supresor (Treg) (Antoine & col., 2004).

A diferencia de lo que sucede en ratones resistentes C57BL/6, en ratones BALB/c infectados con *L. major* se han descrito respuestas inmunitarias susceptibles, en las que hay un aumento en la expresión del receptor de IL-4 (IL-4R) y un descenso en la actividad CD40 y CD80 en las CD que conduce a la disminución de la síntesis de IL-12 e inhibe la maduración y migración de dichas células. Estos mecanismos de evasión empleados por los parásitos favorecen el establecimiento de la infección y retrasan la respuesta inmunitaria adquirida (Brandonisio & col., 2004). Por tanto, en ratones BALB/c la infección con *L. major* genera una respuesta inmunitaria mayoritariamente de tipo Th2 que impide la curación de las lesiones y favorece la progresión sistémica de la enfermedad.

1.2.3. Papel de las células T reguladoras (Treg)

Trabajos recientes de infección experimental en ratón demuestran que los parásitos de *L. major* inducen una acumulación de células Treg CD4⁺ CD25⁺ exclusivamente en los sitios de infección y no en órganos donde no se diseminan los parásitos (Suffia & col., 2006). Las células Treg producen IL-10, una citoquina con capacidad para inhibir la acción leishmanicida de las células T efectoras (Belkaid, 2003; Tabbara & col., 2005). Por tanto, las células Treg favorecen la persistencia parasitaria, aunque también mantienen la memoria inmunológica en ratones resistentes (von Stebut & Udey, 2004). Así pues, el mantenimiento de una memoria inmunológica parásito-específica conlleva a su vez el riesgo de que la enfermedad pueda reactivarse.

Tradicionalmente, se ha considerado que la población de células con el fenotipo TCD4⁺CD25⁺ eran células Treg. Sin embargo, en la actualidad se sabe que CD25 no es un buen marcador para caracterizar células Treg debido a que también lo expresan otras poblaciones celulares siendo imposible distinguir las células Treg de las células T activadas o de las células de memoria. En estudios recientes de citometría se ha comenzado a utilizar el factor de transcripción *Foxp3* como marcador específico de células Treg (Peters & Sacks, 2006). Se trata de una proteína intracelular exclusiva de células Treg conocida también en inglés como *scurfin* (Wing & col., 2005).

1.2.4. Infección experimental con *Leishmania*

1.2.4.1. Dicotomía Th1/Th2

Como consecuencia de las numerosas ventajas que se explicarán más adelante, el ratón constituye un modelo experimental ampliamente utilizado en estudios de infección con *Leishmania*. Teniendo en cuenta la predisposición genética de la cepa hospedadora, este modelo es de gran utilidad para el estudio de las características inmunitarias asociadas con la resistencia y la susceptibilidad a la infección por especies de *Leishmania* causantes de LC, lo que tradicionalmente se denomina dicotomía Th1/Th2 (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Así, se consideran respuestas de tipo Th1 aquellas mediadas por células en las que predomina la síntesis de citoquinas de carácter proinflamatorio (IL-12, IFN- γ y TNF- α) capaces de promover resistencia frente a la infección con *L. major* (Satoskar & col., 1999). Las células NK migran desde el sitio de infección a los DLN y producen IFN- γ pudiendo colaborar en respuestas de tipo Th1 tempranas, aunque no son esenciales, ya que se ha comprobado que las realmente esenciales para curar las lesiones en LC son las células TCD4⁺ productoras de IFN- γ (Teixeira & col., 2006). En cambio, las respuestas inmunitarias de tipo Th2 se caracterizan por la producción de anticuerpos y de las citoquinas IL-4, IL-10 y TGF- β que promueven un fenotipo de susceptibilidad en el hospedador frente a dicha infección (Alexander & Bryson, 2005). Sin embargo, este paradigma Th1/Th2 no es aplicable a las infecciones con las formas viscerales de *Leishmania*. De hecho, la IL-4 no solo no desempeña un papel exacerbador de la LV en ratón, sino que en determinadas circunstancias puede inducir la síntesis de IL-12 y por tanto favorecer un perfil de tipo Th1 (Alexander & Bryson, 2005).

La polarización de las respuestas Th no es tan evidente en casos de LC humana como en ratones infectados con *L. major*, de hecho hay pacientes con LC que desarrollan una respuesta inmunitaria mixta Th1 y Th2 (Bottrel & col., 2001). De todos modos, el estudio de los mecanismos determinantes de la polarización de respuestas Th en el modelo ratón constituye una fuente de información crucial para poder modular respuestas inmunitarias implicadas en vacunación y en diseños terapéuticos con posible aplicación en seres humanos (Gumy & col., 2004).

1.2.4.2. Modelos experimentales de LC

El modelo ratón es muy utilizado en estudios de infección con *L. major*, especie causante de la LC. Recientemente, con el objeto de mimetizar las condiciones de infección natural, las infecciones experimentales se llevan a cabo administrando entre 10-10.000 parásitos metacíclicos por vía intradérmica como haría el propio flebótomo (von Stebut & Udey, 2004). En ratón se ha descrito el modo por el que los parásitos de *L. major* infectan principalmente macrófagos, interfiriendo en su activación y en su capacidad presentadora al disminuir en superficie la expresión de moléculas MHC-I y II. Esto coincide con la denominada fase inicial “silenciosa” en la que durante las primeras cuatro o cinco semanas hay un crecimiento parasitario dentro de los macrófagos de la dermis en ausencia de lesiones. Posteriormente, en la fase proinflamatoria, se desarrolla una respuesta inmunitaria de tipo inflamatoria con la aparición de lesiones cutáneas (Belkaid & col., 2000). El retraso de dicha fase puede conducir a una alta acumulación de parásitos en el hospedador y por tanto dar como resultado la exacerbación de la enfermedad (von Stebut & Udey, 2004). Los ratones de cepas resistentes (C3H, C57BL/6, CBA, entre otras), presentan lesiones cutáneas similares a las que se producen en humanos que finalmente curan de forma espontánea (Alexander & col., 1999; Heinzl & col., 1991; Scott, 1993). En estos casos se establece una respuesta Th1

dependiente de la síntesis de IL-12 por parte de las CD que estimula la producción de IFN- γ en linfocitos TCD4⁺, TCD8⁺ y células NK, para activar los mecanismos leishmanicidas de los macrófagos devolviéndoles su capacidad de sintetizar IL-12 (Belkaid & col., 2002b; von Stebut & col., 2000). En cambio, la infección con *L. major* en la cepa susceptible BALB/c genera una respuesta de tipo Th2 temprana caracterizada por la producción inicial de IL-4 como consecuencia del reconocimiento que hace la subpoblación de células T CD4⁺ V β 4V α 8 de un epítipo del antígeno LACK de *L. major* (Julia & col., 1996; Launois & col., 1997). En la cepa resistente C57BL/6 las células TCD4⁺ presentan una menor expresión en superficie del receptor V β 4V α 8 y además reconocen un epítipo de LACK distinto del que es reconocido en la cepa susceptible, lo cual explica que no se observe un aumento de IL-4 (Gumy & col., 2004). Así, la síntesis inicial de IL-4 disminuye la expresión de IL-12R sobre células TCD4⁺ que interfiere con la producción de IL-12 e IFN- γ y como consecuencia con la capacidad de los macrófagos de sintetizar óxido nítrico (Alexander & col., 1999; Gumy & col., 2004). Además, se produce una expansión de células Th2 productoras de IL-4, IL-10, e IL-13 junto con la producción de anticuerpos. Sin embargo, otros autores han demostrado que parásitos mutantes de *L. major* deficientes en LACK también desarrollan una respuesta de tipo Th2 en ratones BALB/c infectados, lo que sugiere que esta cepa presenta otros defectos genéticos que durante la infección imposibilitan redirigir una respuesta inicial Th2 hacia una de tipo Th1. De hecho, se han detectado defectos intrínsecos que afectan a los receptores de IFN- γ y de IL-12 de linfocitos T así como a la producción de IL-1 en CD, inhibiendo la generación de respuestas inflamatorias en ratones BALB/c (Maldonado & col., 2004; Mohrs & col., 2000; Von Stebut & col., 2003).

Otro mecanismo a través del cual las citoquinas de tipo Th2 pueden favorecer el crecimiento parasitario es mediante la inducción en los macrófagos infectados de la actividad arginasa I. Como ya ha sido descrito en ratones infectados, la arginasa I es una de las isoformas de la enzima arginasa que compite metabólicamente con la enzima iNOS por el aminoácido L-arginina para finalmente generar poliaminas, que son esenciales para la supervivencia de *Leishmania* y su diseminación en el hospedador (Iniasta & col., 2001; Roberts & col., 2004). Se ha demostrado que una alta actividad de la arginasa I constituye un buen marcador de la diseminación parasitaria y de la progresión de la leishmaniosis (Iniasta & col., 2005). Por el contrario, en ratones de una cepa resistente las células de tipo Th1 inducen en los macrófagos infectados la activación de la iNOS para producir L-citrulina y NO leishmanicida, quedando inhibida la actividad arginasa I (Iniasta & col., 2001). Esto demuestra cómo dependiendo del entorno de citoquinas dominante en el tiempo se activa dentro de los macrófagos uno u otro programa de diferenciación con distinto papel inmunitario (Noel & col., 2004). Todo esto da como resultado la incapacidad de la cepa susceptible de redirigir la respuesta susceptible Th2 suscitada por el parásito (Gumy & col., 2004), impidiendo la curación de las lesiones, y favoreciendo la exacerbación de la enfermedad acompañada de la visceralización parasitaria (Himmelrich & col., 2000).

En el fenotipo de susceptibilidad también están implicadas las células T productoras de TGF- β y células Treg CD4⁺ CD25⁺ productoras de IL-10 que se acumulan en el sitio de infección para inhibir la capacidad de las células T efectoras de eliminar los parásitos (Belkaid & col., 2002a; Tabbara & col., 2005). Las células Treg parecen estar claramente asociadas con la persistencia parasitaria, de hecho ha sido descrito recientemente que las células Treg no se diseminan en órganos en los que hay ausencia de parásitos (Suffia & col., 2006). En cambio en los sitios de infección tiene lugar una retención de células Treg mediada por la expresión en superficie de CD103, cuya disminución favorece la reducción del número de células Treg asociado a un cambio hacia un fenotipo resistente de tipo Th1 (Suffia & col.,

2005). Las células Treg están implicadas en la creación de un entorno inmunitario privilegiado con el objeto de evitar respuestas inmunitarias innecesarias contra Ag, infecciosos y no infecciosos, a los que la piel está continuamente expuesta. Esto es aprovechado por los parásitos de *Leishmania* para establecer la infección y persistir, lo cual a su vez es beneficioso para el hospedador para mantener una memoria inmunológica frente a posibles reinfecciones. Por tanto, el establecimiento de un equilibrio inmunitario entre células efectoras y células supresoras es esencial para regular la respuesta inmunitaria *Leishmania*-específica (Peters & Sacks, 2006).

1.2.4.3. Modelos experimentales de LV

Aunque se han empleado diversos modelos animales para analizar la LV, ninguno de ellos reproduce satisfactoriamente la enfermedad humana (Hommel & col., 1995). Los mejores modelos para caracterizar la leishmaniosis son el perro, *Canis familiaris*, y el hámster dorado, *Mesocricetus auratus*. En estas especies, las infecciones con *L. donovani* o *L. infantum* reproducen muchos aspectos clínico-patológicos de la LV humana (Melby & col., 2001a; Requena & col., 2000b), como son hepatoesplenomegalia, hipergammaglobulinemia y una disminución de la respuesta inmunitaria celular (Requena & col., 2004). Incluso también se han descrito cuadros clínicos con manifestaciones de leishmaniosis cerebral en perro (García-Alonso & col., 1996; Vinuelas & col., 2001). Finalmente, la progresión de la enfermedad en ambos modelos puede conducir a la muerte (Handman, 2001; Requena & col., 2000b). Sin embargo, el hámster no es un buen modelo para el diseño de vacunas debido a un defecto innato en la producción de NO que impide la eliminación parasitaria. Además, la falta de reactivos adecuados para el análisis inmunológico limitan el empleo del perro y del hámster (Goto & Lindoso, 2004; Melby & col., 2001a; Requena & col., 2004).

Por otro lado, la alta disponibilidad así como el fácil manejo y la susceptibilidad inicial a la infección con las formas viscerales de *Leishmania* convierten al ratón en la especie animal más empleada como modelo experimental de LV. En el ratón, la progresión de la enfermedad visceral depende de la cepa y de las características genéticas del ratón utilizado, así como de la vía y la cantidad de parásitos administrados. Se ha descrito que el gen *Slc11a1* codifica para la síntesis de un componente fagosomal que confiere a la cepa CBA un fenotipo resistente para controlar la infección en fase temprana. En cambio, los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 carecen de este gen y el crecimiento parasitario temprano en el hígado no puede controlarse (Kaye & col., 2004). Tanto en humanos como en ratones genéticamente susceptibles, los principales sitios de crecimiento parasitario son el hígado, el bazo y la médula ósea. Finalmente, incluso en las cepas susceptibles se produce la curación dependiendo del establecimiento de respuestas inmunitarias órgano-específicas en las que no existe la dicotomía Th1/Th2, como tampoco existe en humanos infectados por *L. donovani* (Alexander & col., 1999; Wilson & col., 2005). Los ratones de la cepa BALB/c infectados con especies viscerales (*L. donovani*, *L. infantum*) carecen de respuestas inmunitarias antígeno específicas de tipo Th2, y no ha sido detectada la síntesis de IL-4 (Melby & col., 2001b). Aunque existe una susceptibilidad inicial a la infección con *L. donovani*, en fases tardías los ratones BALB/c controlan la carga parasitaria manteniendo un bajo nivel de infección de tipo crónico (Mukherjee & col., 2003). Esta fase de susceptibilidad inicial en el modelo BALB/c resulta de gran utilidad para valorar las propiedades potencialmente protectoras de diversas estrategias de vacunación (Carrion & col., 2006).

En la actualidad se realizan experimentos de infección con bajos inóculos parasitarios en fase metacíclica y por vía intradermal, para reproducir en la medida de lo posible las

condiciones de infección natural (Ahmed & col., 2003). Sin embargo, conseguir aislar los parásitos de *L. infantum* en fase metacíclica no resulta fácil en la mayoría de los casos. Por otro lado, las inoculaciones subcutáneas e intradérmicas no garantizan el establecimiento de la infección en todos los ratones (Melby & col., 2001b; Melby & col., 1998). Un trabajo reciente emplea la vía intraperitoneal para administrar los parásitos en los ratones con el objeto de obtener unos datos estadísticos de infección más homogéneos (Rolao & col., 2004). Sin embargo, la inoculación intravenosa sigue siendo la más ampliamente empleada a nivel experimental, ya que se consigue infectar al 100% de los animales inoculados, incluso con inóculos de 1000 promastigotes (Carrion & col., 2006). Además, hay que tener en cuenta que en la infección natural el flebótomo ejerce un efecto de succión en la piel del hospedador que da como resultado una mezcla de las vías intradérmica e intravenosa de administración parasitaria. Por lo tanto, la inoculación intravenosa tiene una relativa similitud con las condiciones de infección natural.

En los últimos años se han empezado a describir algunos de los mecanismos inmunitarios implicados en el desarrollo de respuestas órgano-específicas que conducen a la eliminación parasitaria en el hígado y a la cronificación de la infección en bazo (Handman, 2001). En ratones BALB/c, el control de la infección visceral está asociado con el desarrollo de respuestas inmunitarias celulares parásito-específicas, que incluyen células T CD4⁺ y CD8⁺, la producción de IFN- γ por células T esplénicas y la formación de granulomas hepáticos (Ahmed & col., 2003). A diferencia del hígado, el bazo y la médula ósea llegan a ser sitios de infección crónica donde los parásitos sobreviven durante toda la vida del animal (Engwerda & Kaye, 2000). Aunque en el bazo se produce una infección progresiva, también se generan linfocitos T específicos de *Leishmania* que migran al hígado e inducen el desarrollo de una respuesta inmunitaria adquirida con formación de granulomas y acumulación de células T de memoria. Esto favorece el control de la infección durante la fase de recuperación, después de una fase inicial de crecimiento parasitario (Gomes-Pereira & col., 2004b). La expresión de CXCL10 aumenta p. i. atrayendo hacia el hígado un mayor número de células Th1 que de macrófagos y da como resultado el control de la diseminación parasitaria hepática. En cambio, en las células de bazo infectadas por *L. infantum* hay una mayor expresión de CCL2 que de CXCL10 produciéndose un reclutamiento mayoritario de macrófagos y minoritario de células Th1, lo que favorece un entorno de citoquinas Th2. Esto explica la ausencia de control de la infección en bazo (Teixeira & col., 2006).

Más de la mitad de los parásitos del inóculo inicial llegan a ser eliminados en el bazo por células fagocíticas, en su mayoría macrófagos de la ZM, durante las primeras 24 h. Posteriormente, las CD que presentan en superficie antígenos del parásito migran a la zona PALS esplénica, para producir IL-12 y activar a células productoras de IFN- γ (células T y NK). Aunque estas células activadas deberían migrar al foco de infección en la zona marginal, existen fallos de la respuesta efectora que imposibilita dicha migración. Uno de los fallos se produce como consecuencia de la separación anatómica existente entre ambas localizaciones esplénicas, que impide que los macrófagos de la ZM puedan secretar sustancias quimio-atrayentes de células efectoras procedentes de la zona PALS. Otro fallo es consecuencia de la incapacidad de los macrófagos del foco de infección de mantener activos sus mecanismos leishmanicidas. Esta falta de respuesta inflamatoria granulomatosa en el bazo da lugar a una cronificación de la infección acompañada de esplenomegalia y una profunda alteración estructural de la pulpa blanca con destrucción de CD y pérdida de centros germinales que afectan a la reactividad inmunitaria (Engwerda & Kaye, 2000; Kaye & col., 2004; Melby & col., 2001b; Smelt & col., 1997).

En el hígado, los amastigotes intracelulares crecen rápidamente tras la infección dentro de los macrófagos hepáticos, denominados células de Kupffer. Durante las primeras 48 h de infección los parásitos no pueden ser eliminados con lo que no hay CD maduras presentadoras de antígeno parasitario y se produce un fallo en la producción de IL-12 y en la estimulación de células T. Este fallo favorece que la carga parasitaria alcance un valor máximo durante los primeros 14 días de infección. Se ha propuesto la hipótesis de que las células T previamente activadas en el bazo inducen a su llegada al hígado la síntesis de IL-12 e IFN- γ que favorece una respuesta de hipersensibilidad granulomatosa. Las células de Kupffer infectadas se pueden fusionar constituyendo una célula gigante capaz de producir TNF- α con capacidad leishmanicida y quimio-atrayente de células TCD4⁺, TCD8⁺ y neutrófilos para constituir granulomas (Kaye & col., 2004; Murray & col., 1992). La formación de un granuloma no siempre está asociada con el control parasitario. La eficacia de los granulomas hepáticos para matar los parásitos depende de su grado de maduración (Murray, 2001; Murray & col., 1992). Parece que la familia de citoquinas TNF no están implicadas en la formación de granulomas pero si en la maduración de estos, así como en el mantenimiento de la arquitectura esplénica (Kaye & col., 2004). Stager y colaboradores (Stager & col., 2003) han propuesto una clasificación de las formaciones granulomatosas en función de su capacidad leishmanicida: (i) no se produce reacción granulomatosa, (ii) granuloma inmaduro sin estructura organizada, (iii) granuloma maduro con estructura organizada y actividad leishmanicida, (iv) granuloma estéril donde los parásitos han sido eliminados.

En general, el fenotipo de curación en ratón requiere que las células T aumenten la producción de IFN- γ capaz de inducir en los macrófagos la síntesis de NO para eliminar a los parásitos. En concreto se ha observado que es necesario un aumento de células TCD8⁺ *Leishmania*-específicas precedido de otro aumento en los niveles de células TCD4⁺. Pero la respuesta IFN- γ parásito-específica no es esencial para el control de la infección (Teixeira & col., 2006), mientras que el aumento que presentan las células T en la expresión de CXCL10 durante la fase tardía de infección por *L. infantum*, si es esencial para una adecuada formación granulomatosa. La producción basal de IL-4 que se observa en la infección visceral resta importancia a esta citoquina en el desarrollo de susceptibilidad del ratón, a diferencia del papel de tipo Th2 que desempeña en la infección con *L. major*. Sin embargo, un aumento en los niveles de IL-10 puede atenuar el efecto del IFN- γ sobre la activación de los macrófagos. Este hecho conduciría a que se incrementasen los niveles de TGF- β favoreciendo un fenotipo de no curación con un alta persistencia parasitaria. Aunque la citoquina IL-10 tiene un papel modulador en la respuesta inflamatoria, no se descarta que pueda estar implicada en la preservación de la homeostasis inmunitaria funcionando como una citoquina preventiva del daño tisular generado por un exceso en la producción de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ y citoquinas de la familia TNF) (Gomes-Pereira & col., 2004a; Kaye & col., 2004).

1.3. Búsqueda de antígenos de *Leishmania*

1.3.1. Estrategias de inmunización y vacunación contra *Leishmania*

Existen evidencias clínicas y experimentales que demuestran que la vacunación puede prevenir la leishmaniosis (Murray & col., 2005). Una vacunación efectiva depende de la generación de una respuesta inmunitaria *Leishmania*-específica duradera. De esta forma, ante una nueva exposición al parásito tendrá lugar una rápida presentación de los Ag apropiados con la consiguiente producción de IFN- γ por parte de las células T efectoras (Requena & col., 2004). Actualmente, los esfuerzos de laboratorio se están orientando hacia la búsqueda de Ag

nóveles y adyuvantes, vacunas vivas-atenuadas, Ag recombinantes en forma de proteína o en forma de ADN, bacterias que expresan Ag leishmaniales y CD.

Entre las vacunas que emplean como inmunógenos **parásitos vivos** (estrategia de leishmanización) y que se han probado en seres humanos hay que destacar una vacunación efectiva frente a la infección con *L. major*, pero que tuvo que ser interrumpida debido a la aparición de lesiones cutáneas descontroladas en algunos pacientes acompañadas de estados de inmunodepresión celular (Handman, 2001; Requena & col., 2004). Estos riesgos y la posibilidad de que la enfermedad progrese hacen que la vacunación con parásitos vivos no sea aceptable, aunque en recientes estudios coadministrando CpG los resultados en ratón han sido más favorables (Wu & col., 2006), debido a una activación temprana de las CD acompañado por un aumento de la producción de IL-6 y una disminución de las células Treg en la piel. Por otro lado, la manipulación genética ha hecho posible la obtención de parásitos mutantes deficientes en genes esenciales que limitan su persistencia en los macrófagos del hospedador. Así, parásitos de *L. major* deficientes en el gen que codifica para la enzima DHFR-TS u otros mutantes de *L. donovani* inducen respuestas inmuno-protectivas pero sin causar patología en ratones susceptibles (Papadopoulou & col., 2002; Titus & col., 1995). Incluso, la infección con parásitos de *L. major* en los que se ha inducido experimentalmente una sobre-expresión de la histona H1 muestra una baja infectividad en ratones BALB/c (Smirlis & col., 2006). Estos resultados esperanzadores hacen que esta estrategia de vacunación, que es la que mejor reproduce el curso de la infección natural, siga siendo una posibilidad real.

Las vacunas que emplean como inmunógenos **parásitos muertos**, también conocidas como “vacunas de primera generación”, se han ensayando desde la década de los 70 en fase I (seguridad), fase II (reactividad) o fase III (eficacia) en seres humanos (Melby, 2002; Modabber, 1995), mostrando varios grados de protección. La coadministración de parásitos de *L. major* autoclavados junto con BCG, no parece disminuir la incidencia de leishmaniosis causada por *L. tropica*, *L. major* o *L. donovani* entre los voluntarios vacunados y otros a los que se administró solo BCG, excepto en casos aislados que no se han podido explicar de forma satisfactoria (Sharifi & col., 1998). En cambio, la administración de un cóctel de varias especies de *Leishmania* muertas junto con BCG disminuyó la incidencia de leishmaniosis cutánea en un 73% durante el primer año, aunque esta eficacia desapareció después del segundo año. Por otro lado, *L. amazonensis* autoclavada junto con BCG no tuvo efecto protector. Estas diferencias en la eficacia de las vacunas dejan en evidencia la inestabilidad y la dificultad de la estandarización del método (Murray & col., 2005; Requena & col., 2004).

Debido a la dificultad de producir este tipo de vacunas en grandes cantidades y a otros motivos prácticos, las vacunaciones basadas en la purificación de **fracciones leishmaniales** se han sustituido por el empleo de proteínas recombinantes. De todas formas, cabe mencionar que la vacunación con el Ag FML (ligando fucosa manosa) de *L. donovani* junto con saponina protege en varios modelos experimentales y ha logrado, en fase III, una protección del 92% en un área endémica de Brasil contra LV canina (Borja-Cabrera & col., 2004). En la actualidad ya se está empezando a comercializar con el nombre de Leishmune®, cuyos efectos adversos parecen ser transitorios aunque todavía quedan por resolver los aspectos que desencadenan un perfil inmunitario protector en unos perros vacunados y en otros no (Dantas-Torres, 2006; Nogueira & col., 2005; Parra & col., 2006; Saraiva & col., 2006).

Las técnicas actuales de biología molecular han permitido la obtención de los primeros **Ag recombinantes** protectivos para la elaboración de “vacunas de segunda generación” (revisado por Requena 2004 y Reed (Coler & Reed, 2005; Requena & col., 2004). Entre los

Ag empleados para vacunar contra leishmaniosis están la leishmaniolisina gp63, que muestra efectos protectivos en ratón frente a LC inducida por *L. major* empleando mutantes de *Salmonella typhimurium* o BCG como vectores transformados con el gen gp63 de *L. major*, o incluso en forma de ADN desnudo (Walker & col., 1998; Xu & Liew, 1995). La inmunización con *Toxoplasma gondii* que expresa la KMP-11 de *L. major*, también induce protección en ratón frente a LC (Ramírez & col., 2001). Además, el uso del Ag LACK de *L. infantum* codificado en plásmido o expresado en el virus recombinante vaccinia confiere protección contra *L. major* en ratón (Gonzalo & col., 2002; Gurunathan & col., 1997) y también se ha observado un 60% de protección en perro contra LV (Ramiro & col., 2003). Excepto en casos concretos, como sucede con los antígenos LeIF (Skeiky & col., 1998) y la histona H1 (Solioz & col., 1999) que por sí solos protegen en ratón contra *L. major*, o el Ag HASPB1 contra *L. donovani*, la mayoría de los Ag recombinantes de *Leishmania* requieren de la presencia de algún adyuvante para inducir protección frente a leishmaniosis. La inmunización de ratones BALB/c con el Ag ribosomal P0 en forma de ADN junto con motivos CpG induce protección frente a *L. major* (Iborra & col., 2003), mientras que en forma de proteína sólo previene de la enfermedad en ratones resistentes C57BL/6 (Iborra & col., 2005). La coadministración de los antígenos TSA y STI1 con IL-12 parece mantener un perfil efector Th1, aumentando la durabilidad inducida por la vacuna contra *L. major* (Campos-Neto & col., 2001; Mendez & col., 2001; Stobie & col., 2000). Sin embargo, no está aceptado el uso de la citoquina IL-12 en seres humanos debido a que disminuye la resistencia a agentes infecciosos y favorece problemas de autoinmunidad (Noormohammadi & col., 2001). Otro estudio muestra como la vacunación en monos africanos verdes, *Cercopithecus aethiops* con la histona recombinante H1 junto con el adyuvante Montanide ISA720 (de uso apto en seres humanos), promueve una disminución en el desarrollo de la lesión tras una infección por *L. major* con la propia saliva del vector (Masina & col., 2003).

En los últimos años, las **cócteles vacunales o vacunas recombinantes multi-componentes** están demostrando ser más eficaces que las vacunas constituidas por Ag leishmaniales sencillos, posiblemente debido a que generan respuestas inmunitarias específicas frente a un mayor número de epítomos parasitarios, lo cual podría aumentar las posibilidades de conferir protección en modelos superiores como perros y humanos en los que existe una gran diversidad de complejos mayor de histocompatibilidad (Masina & col., 2003). Así, la combinación de las cisteínas proteasas CPa y CPb de *L. major* junto con el adyuvante poloxamer-407 o en forma de ADN, confiere una respuesta protectora en ratón frente a LC basada en células TCD8⁺ productoras de IFN- γ , a diferencia de la CPa por separado, que no induce protección (Rafati & col., 2002; Rafati & col., 2001; Zadeh-Vakili & col., 2004). También la administración de la vacuna multi-componente compuesta por TSA, LeIF y LmSTI1 induce protección frente a LC en ratón (Skeiky & col., 2002), al igual que la mezcla plasmídica que codifica para LACK, LmSTI1 y TSA con mayor eficacia frente a LC en ratón que inmunizando por separado (Belkaid & col., 2002a; Mendez & col., 2001).

En nuestro laboratorio fue desarrollada una quimera proteica recombinante denominada PQ, compuesta por los determinantes antigénicos de la histona H2A y de las proteínas ribosomales LiP2a, LiP2b y LiP0 de *L. infantum*, cuya posterior administración combinada con BCG elimina los parásitos de ganglio linfático en el 50 % de los perros infectados con *L. infantum* (Molano & col., 2003). En un estudio reciente hemos demostrado que la administración de un cóctel de plásmidos que codifican las cuatro histonas de *L. infantum* (H2A, H2B, H3 y H4) confiere protección en ratón contra la infección con *L. major* (Iborra & col., 2004).

A partir de una genoteca de expresión de ADNc de *L. donovani* ya se había identificado una construcción genética que codifica para las histonas que de forma colectiva inducen una fuerte respuesta Th1 protectora en ratón (Melby & col., 2000). También se ha ensayado una vacuna de ADN multicomponente con 10 antígenos procedentes de *L. donovani*, que parece disminuir la carga parasitaria en ganglios linfáticos de perros con LV (Saldarriaga & col., 2006).

Es importante señalar que las diversas especies de *Leishmania* son muy diferentes, lo cual explica la aparente contradicción que existe entre diversos estudios de protección frente a LC que no pueden ser extrapolados al modelo visceral, véase el caso del antígeno LACK en ratón (Gurunathan & col., 1997; Melby & col., 2001c). Sin embargo, recientemente se ha descrito que una vacuna intranasal con un plásmido que codifica para LACK induce protección en ratón frente a LC y LV (Gomes & col., 2006; Pinto & col., 2004). En general, el desarrollo de vacunas frente a las especies viscerotrópicas de *Leishmania* ha sido menos exitoso que frente a las especies cutáneas. También hay que señalar que los motivos CpG contenidos tanto en el ADN bacteriano, como por sí mismos, inducen un perfil inmunitario de tipo Th1 que se prolonga a lo largo de un mes desde su administración en ratón y que incluso son útiles en el tratamiento de la LC después de 20 días de infección (Gurunathan & col., 2000; Stacey & Blackwell, 1999; Zimmermann & col., 1998). La coadministración de motivos CpG con un extracto de parásitos de *L. major*, induce protección en ratón frente a LC a diferencia de la inmunización con el extracto por separado (Rhee & col., 2002; Walker & col., 1999).

La vacunación basada en componentes salivares del flebótomo pueden constituir una estrategia efectiva en el control de la leishmaniosis. Diversos estudios demuestran que la saliva del vector juega un papel exacerbador en la infección por *Leishmania*. En cambio, la administración en ratón de alguno de los componentes salivares, solos o en combinación con una vacuna anti-*Leishmania*, ha demostrado conferir protección frente a LC (Kamhawi, 2000; Morris & col., 2001; Valenzuela & col., 2001).

El desarrollo de **vacunas basadas en CD cargadas con Ag leishmaniales** con aplicación en seres humanos es complicado y los costes de manipulación son elevados (Antoine & col., 2004). Sin embargo, la vacunación con CD en perros, el principal reservorio de *Leishmania* en los países mediterráneos y en Latinoamérica, puede ser un importante método de control de la enfermedad humana (Brandonisio & col., 2004). Las CD son componentes esenciales del sistema inmunológico con un papel crucial en la inducción y control de respuestas inmunitarias mediadas por células T. Tienen una gran utilidad para el tratamiento y prevención de numerosas enfermedades como alternativa o otras estrategias de vacunación (Ardavin, 2003).

Se ha analizado la capacidad de diversas estrategias de vacunación basadas en CD para inducir respuestas inmunitarias protectoras frente a leishmaniosis en ratones BALB/c infectados con *L. major*. Muchas de estas estrategias se basan en la transferencia adoptiva en ratones BALB/c de BMDC cargadas con Ag leishmaniales. Entre éstas se han administrado BMDC cargadas con *L. major* ± CpG (Berberich & col., 2003; Ramirez-Pineda & col., 2004; von Stebut & col., 2000) y BMDC cargadas con el Ag LeIF o con una mezcla de los Ag leishmaniales recombinantes LACK, KMP-11, gp63 y PSA (Flohe & col., 1998). Los motivos CpG fueron utilizados como inductores de la activación de CD ya que interactúan con estas a través del TLR-9 (Akira & col., 2001; Hartmann & col., 1999; Pulendran, 2004) y promueven respuestas protectoras Th1 y TCD8⁺ citotóxicas anti-*Leishmania* (Chu & col.,

1997; Gummy & col., 2004). Estos estudios muestran que en los ratones vacunados hay una reducción significativa de la inflamación en el sitio de infección en comparación con los controles, pero todavía se desconocen la mayoría de los mecanismos a través de los cuales las vacunas basadas en CD son capaces de generar protección en ratón frente a la infección experimental con *L. major*. Las CD cargadas sólo con CpG o con la gran mayoría de Ag de *Leishmania* no confieren protección en los ratones BALB/c infectados con *L. major* (Antoine & col., 2004; Shah & col., 2003; von Stebut & col., 2000). Sin embargo, algunos Ag leishmaniales pueden conferir protección cuando se mezclan con motivos CpG, aunque la generación de esta respuesta Th1 debe ser regulada cuidadosamente para evitar reacciones proinflamatorias exacerbadas que produzcan patología. La inoculación con macrófagos cargados con Ag no promueven respuestas protectoras (Berberich & col., 2003; Ramirez-Pineda & col., 2004). La incapacidad de los macrófagos infectados de producir IL-12 para conferir protección, a diferencia de las CD, puede explicar este hecho (Flohe & col., 1998).

Desde que se demostró que la **vacunación genética** es capaz de inducir la síntesis de la proteína para la que codifica y generar una respuesta inmunitaria específica en el hospedador, se habla de “vacunas de tercera generación” (Babiuk & col., 1999). La vacunación genética induce una respuesta inmunitaria de mayor duración y además no genera reacciones adversas en el sitio de inoculación a diferencia de las administraciones proteicas. Hay estudios que demuestran como dos o tres administraciones genéticas proporcionan mayor protección frente a leishmaniosis en ratón que una sola (Handman & col., 2000), aunque la eficacia y el tipo de respuesta inmunitaria generada dependen de la vía de administración. Por lo general, la mayoría de las vacunaciones genéticas se han administrado por vía intramuscular. Se acepta que de este modo se consigue, bien la transfección de los miocitos que funcionan como fábricas de expresión antigénica e interaccionan con las CD adyacentes para iniciar la respuesta inmunitaria, bien la transfección directa de las CD del sitio de inoculación que migran posteriormente a otros órganos linfoides (Babiuk & col., 2000a; Babiuk & col., 2000b). Sin embargo, otros experimentos demuestran que con las vías de administración intradérmica y subcutánea se requiere menor cantidad de plásmido y se consigue la transfección directa de CD induciendo una respuesta inmunitaria específica más efectiva y duradera (Condon & col., 1996; Mendez & col., 2002; Porgador & col., 1998). Es frecuente el uso de la estrategia “prime-boost”, consistente en la vacunación genética y la posterior inmunización de recuerdo con la proteína recombinante o con un vector vivo recombinante (Doria-Rose & Haigwood, 2003). Estudios recientes demuestran que la administración de LACK en forma de ADN seguido de otra inmunización con el virus vaccinia Ankara atenuado es capaz de suscitar en ratón respuestas Th1 de tipo protector frente a LC murina y una débil disminución parasitaria frente a LV murina (Dondji & col., 2005; Perez-Jimenez & col., 2006).

1.3.2. Las histonas de *Leishmania*

Diversos componentes parasitarios de *Leishmania*, en su mayoría de naturaleza proteica, pueden desencadenar una respuesta inmunológica como determinantes de superficie o como determinantes intracelulares implicados en patología. Los primeros son invisibles al sistema inmunológico del hospedador, no son inmunogénicos lo que les permite evadir los mecanismos antimicrobianos para establecer la infección. Los determinantes intracelulares en un principio tampoco son visibles al sistema inmunitario y así logran entrar en el hospedador, sin embargo, una vez que se produce la lisis de los amastigotes, estos componentes quedan expuestos al sistema inmunológico. Estos determinantes intracelulares están muy conservados a lo largo de la evolución y contienen epítomos específicos de células T y células B. Su

localización intracelular les hace inaccesibles a los anticuerpos producidos y además generan un fenotipo virulento causante de patología, por lo que se denominan “patoantígenos” (Chang & col., 2003). Entre los determinantes patoantigénicos están los epítopos de complejos proteicos conservados como los de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de los nucleosomas, las proteínas ácidas P0, P2a y P2b de los ribosomas, las proteínas de choque térmico HSP60, HSP70, HSP83 chaperonas, etc (Chang & McGwire, 2002).

Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular muy conservadas evolutivamente entre distintas especies y además están implicadas en la formación estructural del nucleosoma (Wolffe & Hayes, 1999). Los nucleosomas están constituidos por un corazón o núcleo central (Fig. 4) formado por un octámero de histonas (dos pares de dímeros H2A/H2B y H3/H4) envuelto por una doble hélice de ADN de 140 pb y una molécula de histona H1 que sella la envuelta de la parte central del nucleosoma y que se localiza en una zona de ADN puente de 60 pb. Las histonas del núcleo central se disponen con sus dominios globulares C-terminal hacia el interior de la estructura, mientras que sus dominios N-terminal se disponen hacia el exterior siendo susceptibles de ser modificados post-traduccionamente (Luger & col., 1997; Sullivan & col., 2006). La histona H1 interacciona con otras histonas H1 de nucleosomas adyacentes para aumentar el grado de plegamiento del ADN en estructuras de cromatina más complejas hasta constituir cromosomas. Sin embargo, a diferencia del resto de células eucariotas en las que se alcanza un nivel de condensación mayor, en *Leishmania* el grado de condensación que se alcanza es solo de 30 nm, debido a la capacidad limitada de atracción de la histona H1 por moléculas H1 adyacentes.



Figura 4. Esquema de la organización interna del nucleosoma. Las ocho proteínas histonas aparecen coloreadas de forma diferente. La doble hélice de ADN rodea al octámero de histonas y las colas amino-terminales de las histonas interactúan con el ADN.

La H1 es la histona más divergente entre especies. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son semejantes en diversas especies y se encuentran entre las proteínas más conservadas que se conocen. La secuencia de las histonas del núcleo nucleosomal de *Leishmania* presenta una gran similitud con eucariotas superiores principalmente en la región globular, sin embargo el extremo N-terminal es altamente divergente (Galanti & col., 1998).

De hecho, las histonas de los parásitos protozoos pueden sufrir diversas modificaciones covalentes y post-traduccionales, generalmente en sus extremos N-terminal, mediante reacciones catalizadas por actividades enzimáticas. Según la teoría del código de histonas, hay numerosos factores reguladores transcripcionales que poseen dominios capaces de reconocer estas modificaciones específicas de las histonas, constituyéndose así un lenguaje empleado por estos parásitos para dirigir las respuestas celulares (Strahl & Allis, 2000). Estas modificaciones pueden estar implicadas en la virulencia del parásito y finalmente en un aumento del potencial evolutivo de la información genética de la especie (Sullivan & col., 2006).

Por lo tanto, el estudio de las histonas de los protozoos y un mayor conocimiento del código de histonas pueden tener una gran utilidad para el desarrollo de vacunas y de tratamientos farmacológicos frente a enfermedades causadas por estos tripanosomátidos (Sullivan & col., 2006). Las histonas han sido descritas como Ag inmunodominantes que son expuestos al sistema inmunitario durante los procesos de infección natural y experimental en los que un alto porcentaje de perros y seres humanos infectados con *Leishmania* producen anticuerpos específicos anti-histonas del parásito (Nieto & col., 1999; Requena & col., 2000a). Soto y colaboradores (Soto & col., 1997; Soto & col., 1996a; Soto & col., 1995; Soto & col., 1996b; Soto & col., 1999) fueron los primeros en estudiar la inmunogenicidad de las histonas del núcleo nucleosomal de *L. infantum*. Las histonas H2A y H3 han demostrado tener un mayor potencial inmunogénico que las histonas H2B y H4. Los epítomos de las histonas H2A y H2B se localizan en los extremos N- y C-terminal, mientras que los de las histonas H3 y H4 se localizan exclusivamente en el extremo N-terminal. Estos epítomos presentan un alto grado de divergencia en su secuencia de aminoácidos que explica la variabilidad de la estructura primaria de las histonas de los kinetoplastidos. Estos epítomos constituyen dianas contra las que se generan anticuerpos específicos durante la enfermedad causada por la infección con *Leishmania*. Esto es de gran utilidad a la hora de diseñar sistemas de serodiagnóstico de LV canina y humana.

Recientemente se han realizado en ratón diversos ensayos preliminares en los que están implicadas las histonas como método de vacunación frente a leishmaniosis. Así, se ha inducido protección frente a *L. major* a través de la inmunización con H1 (Solioz & col., 1999) y también se han desarrollado parásitos transgénicos que sobre-expresan la histona H1 disminuyendo su infectividad (Papageorgiou & Soteriadou, 2002; Smirlis & col., 2006). También se ha observado que la proteína H2B es capaz de inducir una fuerte proliferación *in vitro*, asociada a la producción de IFN- γ en pacientes recuperados de LC (Probst & col., 2001). La vacunación con H2B en forma de ADN, protege parcialmente en ratones BALB/c contra *L. donovani* (Melby & col., 2000). Recientemente hemos demostrado que la inmunización en ratones BALB/c con un cóctel genético que codifica para las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *L. infantum*, conduce a la generación de una fuerte respuesta celular Th1 protectora frente a *L. major* (Iborra & col., 2004).

Es importante tener en cuenta los posibles riesgos de auto-inmunidad que conllevan el uso de proteínas conservadas, como las histonas, en el contexto de la elección de posibles candidatos vacunales (Chenik & col., 2006). Ya se ha descrito que la proteína H2B contiene dos regiones, la región C-terminal muy conservada con mamíferos, y otra región N-terminal divergente. Cada una de estas porciones de una misma proteína parasitaria induce mecanismos inmunitarios distintos. Aunque la proteína completa H2B administrada en presencia de motivos CpG tiene un ligero efecto protector, solo la parte divergente N-terminal junto con CpG es capaz de conferir una fuerte protección frente a *L. major* en ratones BALB/c. En cambio, la parte conservada C-terminal no induce protección, lo cual podría relacionarse con la mayor eficiencia de esta fracción proteica en la activación de células supresoras Treg Foxp3⁺ que suprimen el desarrollo de células T efectoras favoreciendo la diseminación parasitaria. Probablemente esta sea la razón por la que la proteína completa, que contiene la región C-terminal, genera una protección menos eficiente que la fracción N-terminal por separado (Chenik & col., 2006).

OBJETIVOS



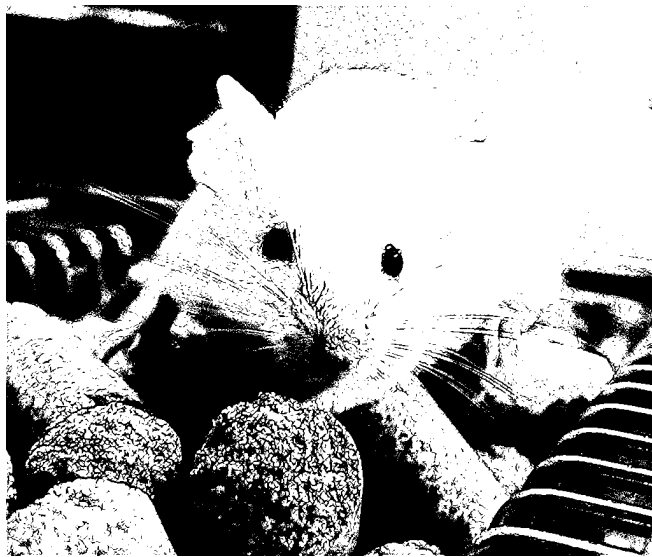
2. OBJETIVOS

Las leishmaniosis engloban un amplio rango de enfermedades infecciosas transmitidas por vector con una prevalencia mundial de 12 millones de casos según datos de la OMS. Dentro del ámbito mediterráneo, en muchas regiones de España la incidencia de la leishmaniosis canina se ha incrementado alarmantemente en los últimos años. Su condición de zoonosis convierte a estas enfermedades en un grave problema sanitario. Entre las estrategias para controlar las distintas formas de leishmaniosis hay que destacar la importancia del desarrollo de vacunas de última generación así como el tratamiento con terapias más efectivas. Desde una perspectiva experimental, en nuestro laboratorio se ha comprobado que la inmunización intramuscular con los plásmidos de ADN que codifican para las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *L. infantum* confieren protección contra la LC en ratón (Iborra & col., 2004).

El principal objetivo de esta Tesis fue la elaboración de nuevas construcciones plasmídicas con las histonas para analizar en detalle su efecto frente a LC y LV, así como profundizar en otras posibles estrategias de vacunación. De esta forma perseguimos los siguientes objetivos:

1. Establecimiento de un modelo experimental alternativo para el estudio de la generación de resistencia inmunitaria frente a la infección con *L. infantum*.
2. Estudio *in vivo* de la transferencia adoptiva de CD cargadas con las histonas de *Leishmania* frente a LC y LV.
3. Elaboración de construcciones genéticas capaces de expresar en células de mamífero las histonas H2AH3, H2BH4, H2AH4 y H2BH3.
4. Análisis de la respuesta inmunitaria que suscita en ratón la administración de las construcciones genéticas que contienen dos histonas frente a la infección con *L. major* o *L. infantum*.

MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medios de cultivo

3.1.1. Medio LB

El medio LB (triptona 1% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v)), en ausencia o presencia del antibiótico de selección (ampicilina 50 µg/ml), fue empleado para cultivar las bacterias de *E. coli* a 37°C. También se cultivaron las bacterias en medio LB sólido (con agar al 1,5% (p/v)).

3.1.2. Medio RPMI

El medio RPMI-1640 (Sigma) fue suplementado con 10% (v/v) de FCS inactivado previamente por calor a 65°C durante 30 min., L-glutamina 2 mM, L-alanina 0,44 mM, L-asparagina 0,4 mM, L-glutamato 0,34 mM, estreptomicina 0,1 mg/ml, penicilina 100 U/ml, gentamicina 50 µg/ml y β-mercaptoetanol 10 µM. El medio RPMI completo fue empleado en el cultivo de esplenocitos y células de ganglio linfático procedentes de ratón.

El medio RPMI 1640 empleado para cultivar CD fue suplementado con 10% (v/v) de FCS inactivado, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina 60 µg/ml y gentamicina 20 µg/ml en presencia del factor GM-CSF (PeproTech, Londres, Reino Unido) 20 ng/ml.

3.1.3. Medio Schneider

El medio Schneider (CBMSO) fue suplementado con 20% (v/v) de FCS inactivado, estreptomicina 0,1 mg/ml y penicilina 100 U/ml. Este medio fue empleado tanto para el cultivo de los parásitos de *Leishmania* hasta su fase estacionaria (2×10^7 parásitos/ml) como para la diferenciación de amastigotes a promastigotes a 26°C con el fin de determinar la carga parasitaria mediante dilución límite.

3.1.4. Medio DMEM

El medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium, Gibco) fue suplementado con FCS inactivado 10% (v/v) y HEPES 10 mM para realizar la electroporación de células tumorales COS7. El medio DMEM para el cultivo de células tumorales COS7 fue suplementado con FCS inactivado 10% (v/v), glutamina 2 mM, estreptomicina 0,1 mg/ml y penicilina 100 U/ml.

3.2. Metodología molecular

3.2.1. Vectores de clonaje y enzimas

Los clonajes para expresar las histonas de *Leishmania* se llevaron a cabo en los vectores de expresión procariota pBluescript II KS- (Stratagene) y de expresión eucariota pcDNA3 (Invitrogen). Los clones obtenidos se describen en el apartado de resultados y el resto de clones del laboratorio que se han empleado se especifican más adelante. Las enzimas de restricción fueron suministradas por Fermentas (Maryland, EEUU). Los marcadores de peso molecular de ADN, fago λ y fago Φ29 digeridos con *HindIII*, procedían del Servicio de

Fermentación del CBMSO. Los marcadores de peso molecular de proteínas fueron suministrados por Sigma.

3.2.2. Técnicas de manipulación de ADN

De forma general se ha seguido la metodología descrita por Sambrook y colaboradores (Sambrook & col., 1989).

3.1.2.1. Purificación y cuantificación de plásmidos recombinantes

Para la extracción de los ADN plasmídicos se emplearon los kits comerciales de Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed), Maxi-prep y Giga-prep Endo-freeTM Kit (Qiagen) según la cantidad de plásmido que fuese necesario obtener. La pureza y cantidad del ADN fueron determinadas en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

3.2.2.2. Células competentes y transformación

Para obtener células ultracompetentes de la cepa XL1Blue de *E. coli*, cuya eficiencia de transformación es de 10^9 unidades formadoras de colonias ufc/ μ g de ADN (frente a eficiencia estándar de 10^6 ufc/ μ g de ADN), se crecieron las colonias siguiendo el método propuesto por Inoue (Inoue & col., 1990). Se obtuvieron los plásmidos recombinantes en grandes cantidades mediante transformación bacteriana por choque térmico. Para ello se mezcló el ADN con las células competentes y se incubó durante 30 min. en hielo. Luego se sometió la mezcla a un choque térmico a 42°C durante 30 seg. y se enfrió nuevamente en hielo durante 2 min. A continuación se añadieron 500 μ l de LB y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente, se sembró la mezcla en placas con LB en presencia del antibiótico de selección (ampicilina) durante 16 h a 37°C para crecer las colonias. En el caso de plásmidos transformados con actividad β -galactosidasa (pBluescript, que poseen el gen señal *lac*), antes de sembrar se añadió a la placa una mezcla de IPTG 100 mM y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, Sigma) previamente preparado en N,N-dimetilformamida.

3.2.2.3. PCR

Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR fueron suministrados por Isogen (Amsterdam, Holanda). Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones estándar para la polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer CETUR Corporation Norwalk, CT), con la adición de Betaína (Sigma) a una concentración final de 2M. Las temperaturas y tiempos de reacción fueron: 5 min. a 94°C, 30 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C y 1 min. a 72°C, y finalmente 5 min. a 72°C.

3.2.2.4. Electroforesis de ADN

Los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa empleando cubetas de desarrollo horizontal. Se empleó un tampón de carga de alta densidad de tipo II descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook & col., 1989). Como tampón de electroforesis se empleó TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 2 mM pH 8,0).

3.2.2.5. Secuenciación

El orden de la secuencia de nucleótidos del ADN se determinó en el servicio de Secuenciación del CBMSO empleando el sistema “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Perkin-Elmer, Foster City, E.E.U.U.).

3.2.3. Purificación en condiciones desnaturalizantes de las proteínas recombinantes H2A, H2B, H3 y H4 fusionadas a histidinas (6xHis-tagged proteins, vector pQE) mediante cromatografía de afinidad.

Las cuatro histonas del núcleo nucleosomal de *L. infantum* se expresaron y purificaron como proteínas recombinantes fusionadas a una cola de 6 histidinas en su extremo amino. Se hicieron transformaciones bacterianas en *E. coli* con los clones anteriormente obtenidos en el laboratorio (Iborra & col., 2004) en el vector de expresión procariota pQE30: pQE30-H2A, pQE30-H2B, pQE30-H3 y pQE30-H4. Se indujo la expresión de las correspondientes proteínas recombinantes añadiendo IPTG 2 mM durante 4 h a 37°C. Después de la inducción, el cultivo bacteriano se centrifugó a 4000 g y el sedimento se sometió a sonicación para producir la lisis en condiciones desnaturalizantes (urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20mM pH 8). Tras una nueva centrifugación, el sobrenadante se hizo pasar a través de columnas de nitrilotriacético-Ni²⁺ agarosa (NINTA, Qiagen) cuya afinidad por el grupo imidazol del aminoácido histidina permitió retener las proteínas recombinantes fusionadas a las colas de histidinas. Seguidamente, mediante un gradiente decreciente de urea (de 8 a 0 M) las proteínas recombinantes fueron renaturalizadas en la columna siguiendo la metodología de Shi y colaboradores (Shi & col., 1997). Se eluyeron las proteínas mediante la adición del tampón imidazol 0,3 M y se dializaron frente a PBS. Finalmente, las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se purificaron a través de una columna de polimixina-agarosa (Sigma, St Louis, MO) para eliminar las endotoxinas bacterianas y se emplearon para cargar las CD en los respectivos ensayos de vacunación.

3.2.4. Purificación de las proteínas recombinantes H2A, H2B, H3 y H4 unidas a MBP (vector pMAL) mediante cromatografía de afinidad.

A partir de los clones obtenidos previamente en nuestro laboratorio en el vector de expresión pMAL-cRI: pMAL-H2A, pMAL-H2B, pMAL-H3 y pMAL-H4 (Soto & col., 1995; Soto & col., 1996b; Soto & col., 1999) se hicieron transformaciones bacterianas en *E. coli*. Así se consiguió reproducir las correspondientes proteínas recombinantes fusionadas a MBP (proteína de unión a maltosa) ya que el vector de expresión empleado codifica la proteína MBP. La purificación de las proteínas MBP-H2A, MBP-H2B, MBP-H3 y MBP-H4 se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en columnas de amilosa siguiendo la metodología proporcionada por el fabricante (New England Biolabs, Inc., Cambridge, MA). Finalmente, cada una de las proteínas recombinantes fusionadas a MBP se empleó posteriormente para la purificación de los anticuerpos anti-histonas.

3.2.5. Purificación de los anticuerpos anti-histonas mediante cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos específicos contra las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *Leishmania* fueron purificados a partir de una mezcla de veinticinco sueros de perros con LV. Para ello, aproximadamente 500 µg de cada histona recombinante fusionada a MBP fue acoplada covalentemente a una resina de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) siguiendo la metodología descrita por el fabricante (CNBr-activated Sepharose 4B, Pharmacia

Biotech). A continuación, la mezcla de sueros caninos (1 ml) se pasó dos veces por cada columna. Después de los lavados, los anticuerpos anti-H2A, anti-H2B, anti-H3 y anti-H4 se eluyeron con tampón glicina 0,1M pH 2,8. Finalmente, el pH de las muestras se equilibró añadiendo 30 µl de Tris 3M pH 8,8 y 20 µl de NaCl 5M. Los anticuerpos purificados fueron empleados como anticuerpos primarios en los ensayos de Western blot.

3.2.6. Electroforesis y estimación de la cantidad de proteína

La electroforesis se llevó a cabo en gradiente lineal de poliacrilamida (10-15%) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) con el sistema Mini-Protean II (Bio-Rad). Las proteínas se detectaron por tinción con azul de Coomassie y se cuantificaron mediante el método Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bradford (Coomassie G-250 en ácido fosfórico y metanol, Bio-Rad).

3.2.7. Western Blot (Inmunodetección de proteínas transferidas a nitrocelulosa)

Las proteínas de los geles SDS-PAGE fueron electrotransferidas en líquido (sistema de Bio-Rad) a membranas de nitrocelulosa PROTRAN® (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Alemania) empleando un tampón de electrotransferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v)). Seguidamente, las membranas fueron impregnadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y Tween 20 al 0,5% (v/v) en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario y secundario en solución de bloqueo a la dilución adecuada (según el título del anticuerpo) durante 3 y 2 horas respectivamente y con los correspondientes lavados con Tween 20 al 0,5% (v/v) en PBS. Los anticuerpos primarios anti-H2A, anti-H2B, anti-H3 o anti-H4 procedían de una mezcla de sueros de perros con LV y como secundarios se emplearon anticuerpos de conejo-anti inmunoglobulinas de perro conjugados con peroxidasa (Cultek, Nordic Immunological Laboratories). La actividad peroxidasa se detectó mediante el sistema “ECL Western blotting analysis system” (GE Healthcare).

3.2.8. Transfección *in vitro* de células COS7.

Con el objeto de analizar si las construcciones genéticas en pcDNA3 se expresan en células eucariotas de mamífero se llevó a cabo su introducción en células COS7 mediante transfección. Después de conseguir un 80-100% de confluencia en las placas de cultivo de células COS7 se procedió a despegarlas con Tripsina-EDTA durante 2 min. en incubador a 37°C. Tras una centrifugación el sedimento se resuspendió en medio DMEM (FCS 10% (v/v), HEPES 10 mM) en tubos eppendorf. A cada tubo se añadieron: 5 µg de la construcción genética, 100 µg de ADN de salmón y 5 µl NaCl 1,5 mM. El contenido se transfirió a cubetas de 4 mm (Bio-Rad) para electroporar las células mediante una descarga eléctrica (pulso de 200 V a 960 mF durante 50 miliseg.). Esto originó poros en la membrana celular por donde entró el ADN. La mezcla se incubó en placa con medio DMEM completo durante 72 horas a 37°C. Finalmente, se resuspendieron las células en tampón Laemmli, se lisaron mediante sonicación y se congelaron a -20°C hasta que se llevó a cabo la electroforesis (SDS-PAGE) y la inmunodetección de las proteínas transferidas a nitrocelulosa.

3.3. Ensayos experimentales

3.3.1. Parásitos

En todos los casos, los promastigotes fueron cultivados a 26°C en medio Schneider. Los parásitos de *Leishmania major* se mantuvieron en estado virulento mediante pase en ratones BALB/c. Los parásitos de la cepa WHOM/IR/-173, obtenida por cortesía de la Dra. Rosa M^a Gonzalo (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid), fueron inoculados en ratón en fase estacionaria. En cambio, los promastigotes del clon V1 (MHOM/IL/80/Friedlin), cedidos por el Dr. David Sacks (NIH, National Institutes of Health, Bethesda, E.E.U.U.), fueron inoculados a los ratones en fase metacíclica y previamente aislados según el método descrito (Sacks & col., 1985; Sacks & Perkins, 1985). Según el mismo, se procedió al lavado y centrifugación a 660 g durante 10 min. de un cultivo estacionario de parásitos y el sedimento se resuspendió en 2 ml de RPMI suplementado con 100 µg de aglutinina de cacahuete PNA (Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, Burlingame, CA.) durante 15 min. para aglutinar con la lectina PNA los promastigotes no metacíclicos. Finalmente se añadieron 10 ml de RPMI y se centrifugaron a 82 g durante 5 min. para aislar en el sobrenadante los promastigotes metacíclicos no aglutinados.

Los parásitos de *Leishmania infantum* (cepa MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1) procedían de un perro leishmaniósico y se aislaron en el Departamento de Medicina y Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (Universidad de Extremadura). La virulencia de la cepa fue mantenida mediante pases repetidos en hámster sirio dorado. Para ello se realizaron dos inoculaciones (espaciadas un mes) por vía intracardiaca con 10⁷ promastigotes estacionarios de *L. infantum* y posteriormente se monitorizó la progresión de la infección mediante palpado esplénico y determinación del título humoral frente a proteínas totales del parásito.

3.3.2. Animales de experimentación

Todos los animales de experimentación fueron suministrados por Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain). Los animales se mantuvieron en el animalario del CBMSO de acuerdo a las condiciones estándar aprobadas por el comité ético de la Universidad Autónoma de Madrid siguiendo a nivel europeo la Directiva del Consejo 86/609/CEE y a nivel nacional el R. D. 1201/2005, ambos relativos a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Para los experimentos de inmunización y vacunación se utilizaron ratones hembra (*Mus musculus*) de 6 semanas de edad pertenecientes a la cepa BALB/c. El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) fue utilizado como animal de pase para mantener el estado virulento de los parásitos de *L. infantum*.

3.3.3. Motivos CpG ODN y proteínas solubles de *Leishmania*

Los motivos CpG ODN (Isogen, Holanda) fueron empleados como inductores de la maduración de CD. Estos motivos son oligodesoxirribonucleótidos inmunoestimuladores que presentaban una modificación fosforotioato con el fin de disminuir la degradación por las endonucleasas celulares y asegurar su entrada en el núcleo. Sus secuencias son: 5'-TCAACGTTGA-3' y 5'-GCTAGCGTTAGCGT-3' (se indica la presencia del motivo CpG).

Las proteínas solubles de *Leishmania* SLA fueron preparadas a partir de cultivos de promastigotes en fase estacionaria siguiendo el procedimiento convencional (Scott & col.,

1987) con ligeras modificaciones, según el cuál tras una centrifugación durante 10 min., se resuspendió el sedimento parasitario en 1 mL de PBS y se micro-centrifugó, lavando dos veces. Los parásitos fueron sometidos a tres ciclos de congelación-descongelación rápida y a tres ciclos de sonicación. Posteriormente, el sobrenadante con las proteínas solubles del parásito fue liofilizado. La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford.

3.3.4. Estrategias de vacunación con CD procedentes de médula ósea

3.3.4.1. Preparación de CD

Con el fin de aislar células precursoras de médula ósea, se prefundieron las cavidades medulares del fémur y de la tibia de los ratones BALB/c con 1 ml de PBS usando una jeringuilla con una aguja de diámetro 30G. La suspensión celular fue cultivada en medio RPMI 1640 específico para CD. El GM-CSF fue añadido a los cultivos celulares los días 0, 3 y 6 de incubación. Después de 7 días, las células no-adherentes fueron desechadas y por citometría de flujo se confirmó el fenotipo mieloide de activación de las DCs (B220⁻, CD8⁻, CD11c⁺, CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺). Las células se resuspendieron (1×10^6 /ml) en medio de cultivo que contenía GM-CSF. Dos grupos de células fueron incubados durante 18 horas con Ag de *L. major* Lm (equivalente a 30 parásitos/célula) en ausencia o presencia de CpG ODN (25 µg/ml). Otro grupo de células fue incubado con una mezcla de histonas H2A, H2B, H3 and H4 (HIS) de *L. infantum* (2 µg/ml de cada histona) en ausencia o presencia de CpG ODN. Un último grupo de células fue incubado sólo con CpG ODN.

3.3.4.2. Transferencia adoptiva de CD

Las CD fueron lavadas y resuspendidas en PBS (5×10^6 células/ml) para ser administradas por vía intravenosa en la vena lateral de la cola en ratones naïve BALB/c de cada grupo experimental (n = 16). Los ratones fueron previamente anestesiados con isoflurano inhalatorio (Baxter S.L., Valencia). Seguidamente las CD (5×10^5 /animal) fueron inyectadas en volúmenes de 100 µl usando jeringuillas de insulina estériles conectadas a una aguja de 30G (BD, Madrid). Los ratones control fueron inoculados con PBS. Un mes después de la transferencia adoptiva los ratones BALB/c fueron infectados como se detalla más adelante en el apartado de infección experimental.

3.3.5. Ensayos de inmunización con los plásmidos recombinantes

Los ratones (n = 16) anestesiados con isoflurano inhalatorio fueron inoculados por vía subcutánea en la almohadilla plantar izquierda con los correspondientes plásmidos recombinantes (80 µg/animal) en un volumen de 50 µl usando jeringuillas de insulina estériles conectadas a una aguja de 30G (BD, Madrid). Los grupos de ratones control fueron inoculados de la misma forma con el plásmido pcDNA3 vacío (80 µg/animal) o con PBS (n = 16). Se realizaron un total de tres inmunizaciones espaciadas dos semanas entre sí. Un mes después de la última inmunización la mitad de los ratones fueron infectados con *L. major* y la otra mitad con *L. infantum* como se detalla más adelante en el apartado de infección experimental.

3.3.6. Ensayos de experimentación animal

3.3.6.1. Infección experimental con *Leishmania*

En los estudios de caracterización de los aspectos inmunohistológicos inducidos por la infección con *L. infantum* en BALB/c, tres grupos de ratones ($n = 16$) fueron inoculados por vía intravenosa en la vena lateral de la cola con los respectivos inóculos infectivos de 10^3 , 10^5 y 10^6 promastigotes estacionarios de *L. infantum* en 100 μ l de PBS. Un grupo control de ratones ($n = 16$) fue inoculado por la misma vía con PBS. A los días 7, 14, 28 y 56, cuatro ratones de cada grupo fueron eutanasiados mediante dislocación cervical.

En los experimentos de transferencia adoptiva de CD, un mes después de la vacunación la mitad de cada grupo experimental de ratones BALB/c ($n = 8$) fueron inoculados por vía intradérmica con 1×10^5 promastigotes de *L. major* en cada oreja. A la semana 10 de infección, cuatro ratones de cada grupo protegido fueron re infectados con 2×10^3 parásitos en la almohadilla plantar derecha. En todos los casos los ratones fueron previamente anestesiados con anestesia gaseosa isoflurano. Los ratones de la otra mitad de cada grupo de vacunación ($n = 8$) fueron inoculados por vía intravenosa en la vena lateral de la cola con 10^5 promastigotes estacionarios de *L. infantum* en 100 μ l de PBS.

Un mes después de de la vacunación con los plásmidos que expresan las histonas recombinantes, la mitad de cada grupo experimental de ratones ($n = 8$) fueron inoculados por vía subcutánea con 3×10^4 promastigotes estacionarios de *L. major* en la almohadilla plantar derecha. Al mismo tiempo, los ratones de la otra mitad de cada grupo de vacunación ($n = 8$) fueron inoculados por vía intravenosa en la vena lateral de la cola con 10^5 promastigotes estacionarios de *L. infantum* en 100 μ l de PBS.

3.3.6.2. Monitorización de la infección con *Leishmania*

En el caso de los ratones infectados con *L. major*, el curso de la infección fue monitorizado semanalmente midiendo con un calibre el incremento de la inflamación en el sitio de inoculación de la oreja o de la almohadilla plantar. En este último caso, el aumento de la lesión se determinó al restar el valor en mm de anchura obtenido en la extremidad contralateral del obtenido en la ipsilateral. Cuando las lesiones de alguno de los ratones de los grupos no protegidos llegaron a ser necróticas o sobrepasaron los 5 mm de inflamación, se sacrificaron los animales.

En el caso de los ratones infectados con *L. infantum*, la forma de monitorizar la progresión de la infección fue extrayendo suero de los ratones para cuantificar la cantidad de anticuerpos IgG anti-SLA mediante ELISA y así planificar el momento del sacrificio en función de la respuesta humoral detectada.

3.3.6.3. Extracciones de sangre, sacrificios y necropsias

Mediante punción del seno venoso retro-orbitario se obtuvieron muestras sanguíneas de los animales anestesiados previamente con isoflurano. Después de 1 h a 37°C y 1 h a 4°C, tuvo lugar la retracción completa del coágulo sanguíneo y tras una micro-centrifugación durante 10 min. se obtuvo el suero que se guardó a -20°C en glicerol en una relación 1:1. Los animales fueron eutanasiados mediante dislocación cervical y se llevaron a cabo las correspondientes necropsias para extraer algunos de los siguientes órganos, dependiendo del

experimento: hígado, bazo, ganglios linfáticos, timo, riñón y fémur, así como lesiones del sitio de infección (oreja o almohadilla plantar en el caso de los ratones infectados con *L. major*). Se destinaron secciones de estos órganos bien a la determinación de la carga parasitaria, bien a una valoración histológica. En este último caso las secciones fueron fijadas en formaldehído 10% (v/v). En el caso de los bazos y ganglios linfáticos, también se tomaron muestras para ensayos de proliferación celular, producción de citoquinas y citometría de flujo.

3.3.7. Determinación del valor hematocrito

Se obtuvieron muestras de sangre y se mezclaron con anticoagulante (heparina) en micro-capilares de hematocrito (BRAND, Wertheim, Germany). Los capilares fueron sellados por un extremo y se sometieron a micro-centrifugación. El porcentaje de células sanguíneas en el volumen total de sangre completa se determinó por comparación con una escala patrón.

3.3.8. Determinación de la carga parasitaria

Después de eutanasiar los ratones infectados con *L. infantum* se determinó el peso total de los órganos y se tomaron secciones de bazo e hígado de 50 y 100 mg, respectivamente para determinar la carga parasitaria. En los ensayos de caracterización de los aspectos inmunohistológicos en el modelo BALB/c, se midieron las cargas parasitarias en hígado, bazo y médula ósea a los días 7, 14, 28 y 56 p. i. La médula ósea fue obtenida como ya se ha descrito anteriormente. En los experimentos de infección con *L. major*, las cargas parasitarias fueron evaluadas en la lesión del punto de inoculación (oreja o almohadilla plantar, según el caso) en el ganglio linfático drenante y en el bazo.

En todos los casos las cargas parasitarias se determinaron mediante dilución límite (Buffet & col., 1995). Para ello se preparó una suspensión celular mediante el macerado de los tejidos u órganos en 1ml de medio Schneider. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 1:4 de la suspensión de tejido homogeneizado en una placa de 96 pocillos y fueron cultivadas a 26°C durante 10 días. Los pocillos fueron examinados para detectar promastigotes. El número total de parásitos por tejido se calculó a partir del recíproco de la dilución más alta donde se detectaron promastigotes, teniendo en cuenta el peso del órgano completo.

3.3.9. Ensayos de ELISA

3.3.9.1. Respuesta humoral

La detección de anticuerpos *Leishmania*-específicos se hizo mediante ELISA. Placas de tipo estándar se tapizaron con el Ag correspondiente durante 16 h a 4°C con 100 µl de SLA (2 µg/ml) o con la mezcla HIS de *L. infantum* (2 µg/ml) diluida en PBS. Todos los periodos de incubación se hicieron en condiciones de agitación a temperatura ambiente. Después del tapizado con el Ag, se hicieron tres lavados de las placas con PBS conteniendo 0,5% Tween 20 y se incubaron durante 2 h en solución de bloqueo (5% de leche en polvo en PBS-0,5% Tween 20). Después de otro lavado, los pocillos fueron incubados con los sueros de los ratones a diferentes diluciones durante 2 h. Posteriormente, los pocillos fueron lavados de nuevo. Como anticuerpos secundarios se emplearon anti IgG total o los isotipos anti IgG1 e IgG2a cabra anti-ratón con peroxidasa (Nordic Immunology, Tilburg, Holanda) diluidos 1/1000. Después de 1 h de incubación, las placas fueron lavadas y reveladas con ortho-phenylenediamine OPD (DAKO, Dinamarca) como sustrato para la peroxidasa. La reacción

se paró añadiendo H_2SO_4 3N (50 μl /pocillo) a los 15 min. Finalmente, la absorbancia se midió a 450 nm en el lector 2001 de microplacas (Whittaker, Indiana, EEUU).

3.3.9.2. Determinación de citoquinas

Las suspensiones celulares ($4 \times 10^6/\text{ml}$) procedentes de ganglios drenantes o de bazo fueron estimuladas *in vitro* en placas de 96 pocillos bien con CD vacías o infectadas con *L. major*, bien con SLA (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o HIS (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), como ya se ha descrito anteriormente. Los sobrenadantes fueron recogidos después de 48 h para medir los niveles de IFN- γ , IL-10 e IL-4 mediante kits comerciales de ELISA (Diacclone, Francia). Las placas fueron tapizadas con el anticuerpo de captura siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizaron los correspondientes lavados y bloqueo con BSA 2-5% (p/v) en PBS y se añadieron los sobrenadantes de las muestras. Finalmente, se añadió el anticuerpo biotinilado y la correspondiente enzima peroxidasa HRP-estreptavidina. Como sustrato de la reacción se empleó TMB. La reacción se detuvo añadiendo H_2SO_4 3N (50 μl /pocillo) a los 15 min. Finalmente, la absorbancia se midió a 450 nm en el lector 2001 de microplacas (Whittaker, Indiana, EEUU) elaborándose las correspondientes curvas patrón.

3.3.10. Citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de las células productoras de IFN- γ o IL-4 y de las células Treg foxp3⁺, así como el nivel de CD que expresan moléculas coestimuladoras (CD80⁺, CD86⁺). También se han determinado los niveles de expresión de otras moléculas en la superficie de linfocitos y otras células procedentes de órganos linfoides de ratón. En todos los casos, el tampón de tinción (PBS staining) empleado fue PBS suplementado con 1% (v/v) de FCS. Para el caso de las tinciones intracelulares, las fijaciones y las permeabilizaciones se hicieron con Cytofix/CytopermTM (Becton Dickinson) y los lavados con CytowashTM (Becton Dickinson). Como marcadores de superficie o intracelulares se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados con uno de los siguientes fluorocromos: FITC, PE, o Cy. Todos los reactivos y anticuerpos monoclonales fueron suministrados por Becton Dickinson (PharMingen, San Diego, California). Los marcadores de superficie empleados fueron los siguientes: anticuerpos (PE)-conjugados anti-ratón contra CD45R/B220 (RA3-6B2), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), Ly-6G/Gr1 (RB6-8C5), CD40 (3/23), CD80 (16-10A1), CD86 (GL1). Anticuerpos (FITC)-conjugados contra CD3 (145-2C11) y CD11c (HL3). Anticuerpos (Cy)-conjugados contra TCR β (H57-597). Los marcadores intracelulares anti-ratón empleados fueron los siguientes: anticuerpos (PE)-conjugados contra IL-4 (11B11), o Foxp3 (FJK-16s) y anticuerpos (FITC)-conjugados contra IFN- γ (XGM.1.2). La caracterización del fenotipo celular fue determinada mediante el citómetro FACsCalibur (Fluorescent-Activated Cell Sorter, Becton Dickinson) usando el programa de adquisición de muestras CellQuestTM (Becton Dickinson) y el programa de análisis FlowJo (Tree Star, Inc).

Las suspensiones celulares aisladas de los órganos linfoides (bazo o ganglios linfáticos) libres de eritrocitos fueron incubadas a 5×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo cónico. Las células se lavaron y se incubaron con anti-FC γ RII/III mAb (FcBlock) (PharMingen, San Diego, California) en 50 μl de PBS staining (por pocillo) durante 5 min. en hielo para bloquear las uniones no específicas. Seguidamente, se hizo la tinción de las células con los marcadores de superficie durante 20 min. en hielo y oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con PBS staining y analizadas en el citómetro como se indicó anteriormente.

3.3.10.1. Células productoras de IFN- γ ó IL-4 y células Treg

Las suspensiones celulares aisladas de ganglios linfáticos maxilares fueron estimuladas *in vitro* (4×10^6 células/ml) con CD a una relación de 5:1 durante 48 h en placas de 96 pocillos de fondo en “U”. Previamente las CD fueron cargadas durante 24 h con parásitos de *L. major* en una relación de 5 parásitos: 1 CD, o cargadas con HIS ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Después de 48 h, se añadió el reactivo GolgiStopTM para detener el tránsito de vesículas de membrana al Golgi y el cultivo se incubó durante 4-5 h. Posteriormente, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo cónico, se hicieron dos lavados y se incubaron con FcBlock en 50 μl de PBS staining durante 5 min. en hielo para bloquear las uniones no específicas. Después, se hizo la tinción celular con el marcador de superficie TCR β (Cy)-conjugado para detectar los linfocitos T. También se emplearon anticuerpos de superficie frente a CD4 o CD8 (PE)-conjugados y se incubaron durante 20 min. en hielo y oscuridad. El siguiente paso fue la fijación y permeabilización de las células en el tampón Cytotfix/Cytoperm durante 20 min. en hielo y oscuridad. Finalmente, las células se lavaron y se incubaron con los anticuerpos intracelulares anti-ratón: contra IL-4 o Foxp3 (PE)-conjugados, o con IFN- γ (FITC)-conjugado, durante 30 min. en hielo.

3.3.10.2. Moléculas coestimuladoras (CD80⁺, CD86⁺) en células CD11c⁺ de DLN

Suspensiones celulares limpias de eritrocitos procedentes de DLN maxilar fueron incubadas a una concentración final de 5×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células fueron lavadas e incubadas con FcBlock 0.5 μl en 50 μl de PBS con FCS 1% (v/v) por pocillo en hielo durante 5 min, y posteriormente, fueron teñidas con anticuerpos anti-ratón contra CD80 (16-10A1) y CD86 (GL1) (PE)-conjugados y contra CD11c (FITC)-conjugado (HL3) durante 20 min. en hielo. Todos los reactivos y anticuerpos conjugados monoclonales (1 μl en 50 μl de PBS con FCS 1% (v/v)) fueron suministrados por Becton Dickinson (PharMingen, San Diego, California). Las células fueron lavadas dos veces con PBS FCS 1% (v/v) y analizadas en el citómetro como se indicó anteriormente.

3.3.11. Determinación de nitritos y de la actividad arginasa

Las células SPMC fueron incubadas *in vitro* durante 48 h en placas de 48 pocillos (COSTAR) a 4×10^6 células/ml en presencia de SLA ($6 \mu\text{g/ml}$) a 37°C y CO₂ 5%. Para determinar el nivel de nitritos, después de la incubación, se tomaron alícuotas por duplicado de 100 μl de sobrenadante de cultivo y se mezclaron en una placa de 96 pocillos de cultivo con un volumen equivalente del reactivo de Griess. La concentración de nitritos se determinó a partir de una curva patrón elaborada con diluciones de nitrito de sodio de concentraciones conocidas. Finalmente, la absorbancia se midió a 540 nm en el lector 2001 de microplacas (Whittaker, Indiana, EEUU).

Para determinar la actividad arginasa, después de la incubación de las SPMC, se siguió un método ligeramente modificado que inicialmente fue propuesto para medir arginasa en macrófagos activados (Corraliza & col., 1994). De acuerdo con dicho método, las células quedaron adheridas al fondo de los pocillos mediante centrifugación y para lisar las membranas celulares se añadió a cada pocillo 50 μl de Tritón X-100 (0,1% v/v en agua) se agitó y se añadieron 50 μl de Tris-HCl 200 mM pH 7,4. Luego se despegaron las células con ayuda de un émbolo, se recogieron los lisados celulares y se pasaron a tubos eppendorf. A continuación se añadieron 5 μl de MnCl₂ 1 M (coenzima de la arginasa) y se incubó durante 10 min. Luego se añadieron 25 μl de arginina 0,5 M, pH 9,7 (sustrato de la arginasa) seguido

de incubación a 37°C durante 1 h. En paralelo se hizo una curva patrón usando cantidades crecientes (1,5- 30 µg) de urea. Posteriormente se añadieron 400 µl de una mezcla ácida compuesta por H₂SO₄ 18 M, H₃PO₄ 14,7 M y H₂O (en relación 1: 3: 7). Para cuantificar la urea formada se añadieron 25 µl de de isonitropropiofenona (ISPF 3% en etanol absoluto). Los tubos eppendorf se hirvieron a 100° C durante 30 min. Finalmente, las muestras se trasladaron a placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) en duplicados de 200 µl y se midió la absorbancia a 540 nm. en el lector 2001 de microplacas (Whittaker, Indiana, EEUU).

3.3.12. Ensayos de proliferación celular

Las células esplénicas (4×10^5 células/pocillo) se incubaron por triplicado en placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) y fueron estimuladas con ConA (Sigma), LPS (2 µg/ml) o con SLA (6 µg/ml) en 200 µl de medio RPMI 1640 completo. A las 16 h antes de cumplir las 72 h de incubación se añadió 1 µCi de [³H]-timidina (5Ci/mmol; Amersham) por pocillo en 50 µl de medio RPMI 1640 completo. Finalmente las células se transfirieron a un filtro de fibra de vidrio usando el aparato cell harvester (Inotech, Dottikon, Suiza) y el nivel de proliferación celular fue expresado como cpm mediante la determinación de la incorporación en las células de [³H]-timidina en el contador de centelleo (Wallac 1450 Microbeta® Trilux, Turku, Finlandia).

3.3.13. Estudio histopatológico

Secciones tisulares de las almohadillas plantares, orejas, bazo, hígado, ganglios linfáticos, timo y riñón pertenecientes a los ratones eutanasiados de los diferentes experimentos fueron fijadas en formaldehído 10%, incluidas en parafina y posteriormente cortadas con un microtomo en secciones de 4 µm. Finalmente, fueron montadas y teñidas con H&E. En los cortes histológicos se evaluó la alteración de la arquitectura anatómica del órgano, la presencia de infiltraciones celulares inflamatorias así como la presencia de parásitos de *Leishmania*. Los análisis histológicos y las interpretaciones de los cortes se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Ana Nieto Ruiz de Zarate (Banco Andaluz de Líneas Celulares. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Virgen de las Nieves. Granada, España).

Para cuantificar el número de folículos linfoides en la pulpa blanca esplénica y en los ganglios linfáticos, se examinaron 10 campos microscópicos por grupo a los días 7, 14, 28 y 56 después de la infección. La depleción linfoide en los órganos linfoides fue clasificada siguiendo como criterio histológico el porcentaje de folículos linfoides desaparecidos en comparación al número medio observado en ratones sin infectar, estableciendo cuatro categorías: (i) sin depleción, (ii) ligera depleción linfoide (1-20% de folículos linfoides desaparecidos), (iii) depleción moderada (20-40% de folículos linfoides desaparecidos), (iv) daño tisular severo (más del 40% de folículos linfoides desaparecidos). Para cuantificar el porcentaje de los distintos tipos de granulomas en hígado, se examinaron microscópicamente 50 focos infectados en las secciones hepáticas. Las formaciones granulomatosas fueron clasificadas siguiendo como criterio el grado de maduración del granuloma (Stager & col., 2003), estableciendo cuatro categorías: (i) sin reacción granulomatosa, (ii) granuloma inmaduro sin estructura organizada, (iii) granuloma maduro con estructura organizada, (iv) granuloma estéril donde los parásitos han sido eliminados.

3.3.14. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el test t de Student con el programa STATISTICA usando datos de experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. Modelo experimental BALB/c de LV. Estudio de las características inmunohistológicas inducidas por la infección con *L. infantum*

4.1.1. Características clínicas de los ratones infectados con *L. infantum*

No se observaron diferencias significativas entre los ratones infectados y los controles sin infectar en lo referente a los siguientes parámetros: niveles de celularidad en medula ósea ($5\text{-}7 \times 10^6$ células/ml), valores de hematocrito en sangre periférica (48-55 %) y niveles de proliferación de esplenocitos en presencia de SLA o medio (datos no mostrados). En los ratones infectados con 10^6 parásitos se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) de la proliferación celular a los 56 días p. i. en respuesta a la estimulación *in vitro* con Con A (83149 ± 9933 cpm.) o LPS (21408 ± 2669 cpm) con respecto a los valores control (143752 ± 11432 cpm.; 55380 ± 3290 cpm). Además, en el bazo de los ratones infectados con el inóculo parasitario más elevado se detectaron los mayores niveles de nitritos (Fig. 1) al día 56 p. i. Al final del experimento, en estos ratones también se observaron las cantidades más altas de arginasa por millón de esplenocitos (1.4 mU) comparado con los ratones control o infectados con 10^3 o 10^5 parásitos (0.8 - 1 mU de arginasa, respectivamente).

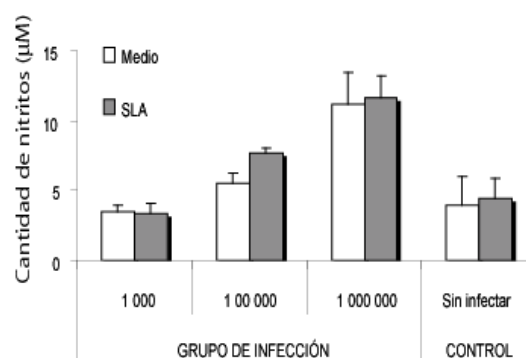


Figura 1. Producción de nitritos en células de bazo tras 48 h de cultivo en presencia de medio o SLA en ratones infectados y controles a los 56 días de infección.

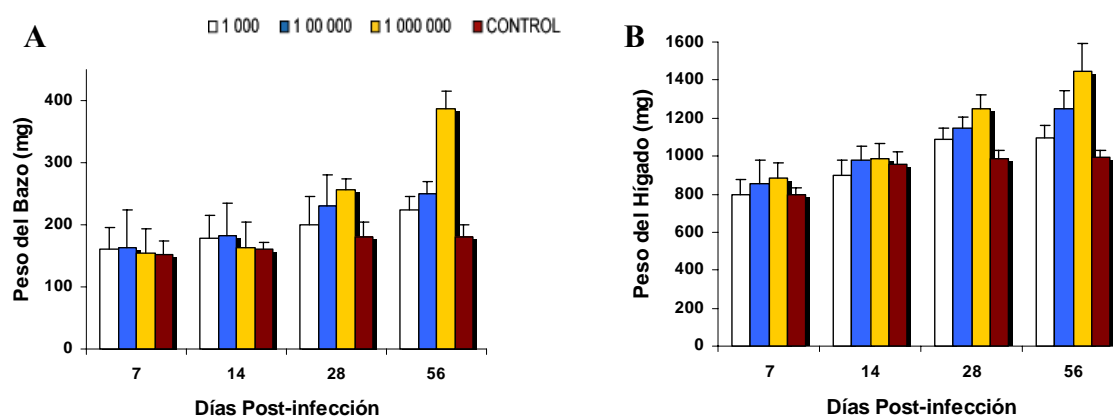


Figura 2. Pesos de los bazos (A) e hígados (B) de los ratones infectados y controles durante los 56 días de experimento

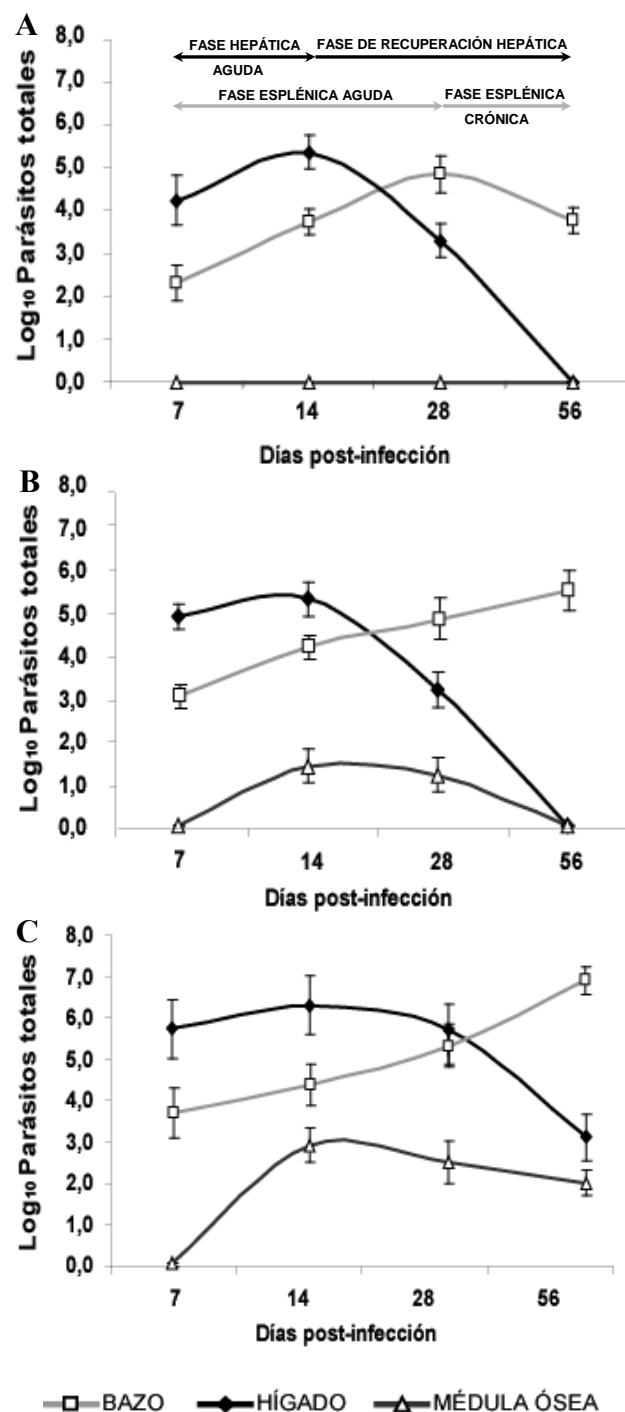
En todos los animales, se presentaron signos de hepatoesplenomegalia conforme progresaba el tiempo de infección. Estos signos fueron más pronunciados en los ratones infectados con 10^6 parásitos que en los otros grupos de infección (Fig. 2. A-B).

4.1.2. Detección parasitaria

En todos los ratones inoculados se detectaron parásitos, lo que indica que los tres tamaños de inóculo parasitario fueron capaces de establecer la infección visceral. Como se observa en la figura 3, no hubo diferencias estadísticas en la carga parasitaria hepática entre los ratones inoculados con 10^3 , 10^5 o 10^6 parásitos de *L. infantum* a los días 7 y 14 p. i. La carga parasitaria en hígado disminuyó en todos los grupos al día 28 p. i., pero de forma estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en los ratones infectados con 10^3 y 10^5 parásitos. Finalmente, sólo se detectó persistencia parasitaria en hígado a los 56 días p. i. en los ratones inoculados con 10^6 parásitos. En bazo no hubo diferencias estadísticas en la carga parasitaria a los días 7, 14 y 28 p. i. entre los animales de los distintos grupos de infección. A los 56 días p. i. en los ratones infectados con 10^3 y 10^5 promastigotes la carga parasitaria disminuyó o se mantuvo respectivamente. Sin embargo, en los ratones infectados con 10^6 promastigotes la cantidad de parásitos aumentó de forma significativa ($P < 0.05$). En médula ósea se detectaron las mayores diferencias de carga parasitaria entre los tres grupos de infección experimental. A diferencia de los animales inoculados con 10^3 promastigotes en los que no se detectaron parásitos, en la médula ósea de los ratones infectados con 10^5 promastigotes se detectó la presencia de parásitos a los días 14 y 28 p. i., aunque estos fueron eliminados a los 56 días p. i. En cambio, en los ratones inoculados con 10^6 parásitos hubo persistencia parasitaria en la médula ósea hasta el final del experimento.

Estos resultados de carga parasitaria nos permitieron establecer las siguientes fases durante la infección. En hígado fue posible diferenciar entre una fase aguda y otra de recuperación en todos los ratones infectados.

A diferencia de los grupos infectados con 10^3 y 10^5 parásitos, en el grupo infectado con 10^6 parásitos la fase de recuperación hepática no alcanzó la esterilidad después de 56 días



p. i. Por otro lado, en bazo pudimos establecer una fase aguda seguida de una fase crónica, que en un estudio previo se prolongaba al menos durante 10 meses, incluso en los ratones inoculados con 10^3 parásitos (resultados no mostrados).

En resumen, las inoculaciones con 10^3 , 10^5 o 10^6 parásitos consiguieron establecer la infección en fases tempranas. A diferencia de los ratones infectados con 10^6 parásitos, los ratones infectados con inóculos parasitarios más bajos fueron capaces de controlar la infección llegando a eliminar los parásitos del hígado y de la médula ósea.

4.1.3. Respuesta humoral contra *Leishmania*

A pesar de que los ratones de todos los grupos de infección presentaron cargas parasitarias similares a los días 7 y 14 p. i., sólo se detectaron anticuerpos del isotipo IgG1 anti-SLA durante esos días en los animales infectados con 10^6 parásitos (Fig. 4. A). A partir de los días 28 y 56 p. i. se detectaron anticuerpos IgG1 anti-SLA en los sueros de los ratones infectados con 10^3 y 10^5 parásitos, pero sus títulos humorales fueron significativamente menores que los de ratones infectados con 10^6 parásitos. Los anticuerpos IgG2a anti-SLA se detectaron a partir de los 28 días p. i. en ratones infectados con 10^5 y 10^6 parásitos (Fig. 4. B) y persistieron al menos hasta el día 56 p. i. En todos los casos los títulos de IgG2a fueron aproximadamente 10 veces inferiores a los títulos de IgG1.

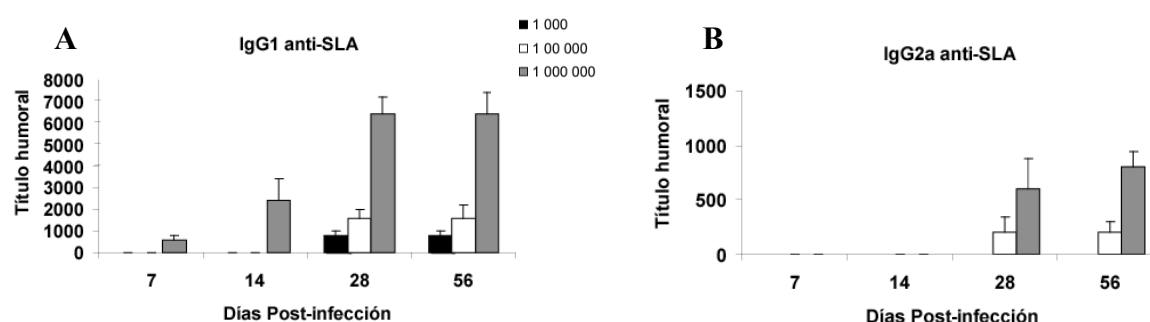


Figura 4. Título de anticuerpos *Leishmania*-específicos del suero de los ratones infectados durante el curso de la infección. Isotipos IgG1 anti-SLA (A) e IgG2a anti-SLA (B).

4.1.4. Producción de citoquinas

Durante los primeros 14 días de infección, los esplenocitos de todos los grupos de ratones infectados sintetizaron pequeñas cantidades de IFN- γ e IL-10, en respuesta a SLA, que fueron similares a las producidas en los cultivos control (Fig. 5. A-B). A los 28 días p. i. se detectó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la producción de IFN- γ e IL-10 en los ratones infectados con 10^5 y 10^6 parásitos. Los niveles de IFN- γ descendieron ligeramente a los 2 meses de infección. La producción de IL-10 aumentó en los ratones infectados con 10^6 parásitos mientras que dicha producción descendió significativamente ($P < 0.05$) en los animales infectados con 10^5 parásitos después de 56 días p. i.

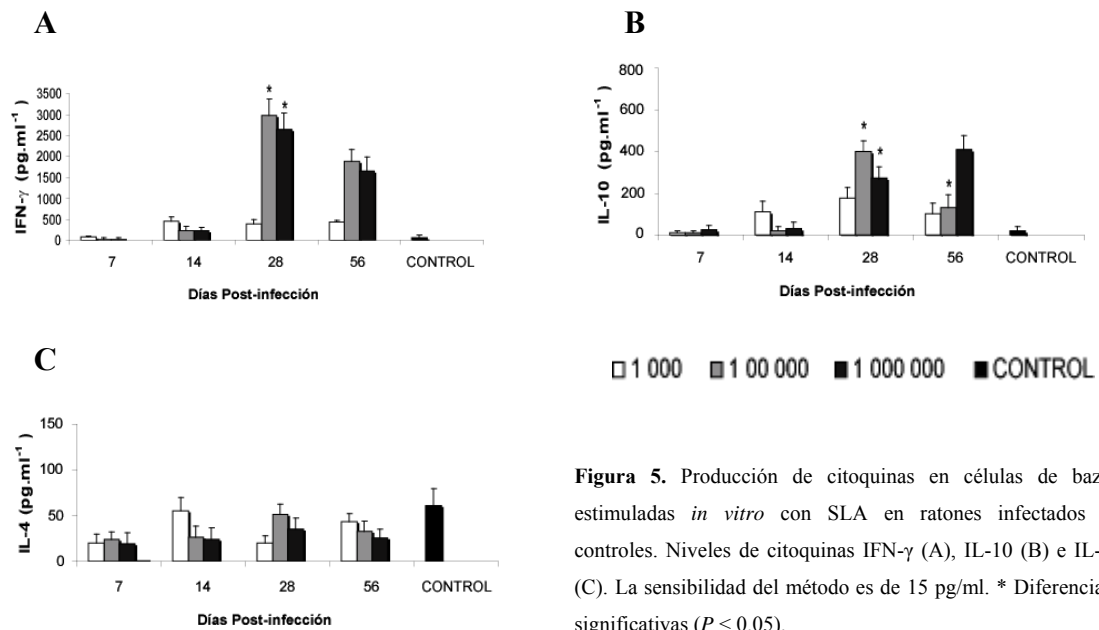


Figura 5. Producción de citoquinas en células de bazo estimuladas *in vitro* con SLA en ratones infectados y controles. Niveles de citoquinas IFN- γ (A), IL-10 (B) e IL-4 (C). La sensibilidad del método es de 15 pg/ml. * Diferencias significativas ($P < 0.05$).

No se detectó ninguna diferencia significativa en la producción de IL-4 en los cultivos de esplenocitos estimulados con SLA entre los ratones inoculados con cualquiera de los tres inóculos infectivos y los controles sin infectar (Fig. 5. C).

4.1.5. Fenotipo de las células esplénicas. Citometría de flujo

La Tabla I muestra la variación en las fases temprana y tardía de infección del número de células B, células T, CD, CD activadas y granulocitos, definidos respectivamente por los marcadores B220⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺, CD11c⁺, CD11c⁺ CD40⁺ y GR.1⁺.

Grupo de infección	Día p.i.	B220 ⁺	T CD4 ⁺	T CD8 ⁺	GR.1 ⁺	CD11c ⁺	CD11c ⁺ CD40 ⁺
1 000	0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	7	0.94	1.12	0.82	1.65 *	1.08	0.95
	56	1.02	1.14	0.99	1.08	1.11	1.07
1 00 000	0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	7	0.91	1.10	0.87	0.71	1.24	1.26
	56	0.99	1.06	1.11	0.95	1.10	0.90
1 000 000	0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	7	0.95	1.14	0.80	0.73	1.98 *	1.96 *
	56	1.48	1.09	1.18	1.19	1.14	1.05

Tabla I. Incremento de las poblaciones celulares específicas de bazo en ratones infectados respecto a los controles a los días 7 y 56 p. i. Las células fueron marcadas para la detección de B220⁺, CD11c⁺, CD40⁺, GR1⁺, CD4⁺ y CD8⁺. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre ratones vacunados y controles (* $P < 0.05$).

Para cada una de las poblaciones celulares se calculó su índice de aumento o descenso relativo al valor basal (considerado como 1) de los ratones control. No hubo diferencias estadísticas en el número de células B y T esplénicas procedentes de los ratones infectados comparado con los ratones sin infectar. Sin embargo, a los 7 días p. i., los ratones infectados con 10^3 parásitos presentaban un aumento significativo ($P < 0.05$) en el número de granulocitos comparado con los no infectados. Además, se observó un aumento de células $CD11c^+$ y $CD11c^+ CD40^+$ a los 7 días p. i. en los ratones infectados con 10^6 parásitos en comparación a los ratones control ($P < 0.05$).

4.1.6. Estudio histológico de la infección visceral en ratones BALB/c

La administración de 10^3 parásitos no generó lesiones apreciables en los órganos analizados de los ratones. En cambio, en los ratones infectados con 10^5 y 10^6 parásitos se observaron alteraciones histopatológicas en bazo, ganglios linfáticos e hígado. Sin embargo, en la figura 6 se observa que ningún animal presentó signos de patología en timo o riñón. En bazo y en los ganglios linfáticos se observó hipertrofia e hiperplasia de las células del sistema mononuclear fagocítico, acompañado de una depleción linfóide en la pulpa blanca esplénica.

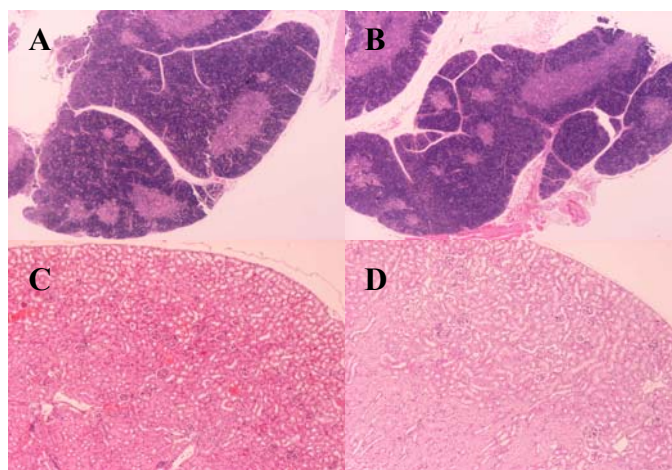


Figura 6. Aspecto histológico de las secciones de timo y riñón teñidas con H&E. Secciones de timo de ratón infectado con 10^6 parásitos al día 56 p. i. (x4 A) y ratón control (x4 B). Secciones de riñón de ratón infectado con 10^6 parásitos a los 56 días p. i. (x4 C) y ratón control (x4 D).

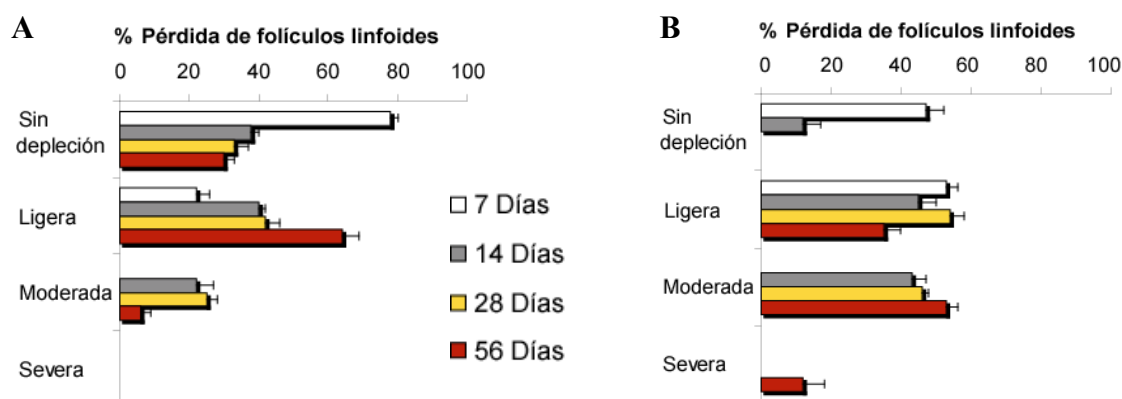


Figura 7. Grado de pérdida de folículos linfoides en la pulpa blanca del bazo en los ratones infectados con 10^5 (A) y 10^6 parásitos (B). Los datos son medias \pm errores estándar de ratones individuales ($n = 4$).

Durante el curso de la infección todas las lesiones cuantificadas en bazo fueron clasificadas en función del grado de pérdida de folículos linfoides observado, con el fin de valorar la evolución del grado de lesión entre los ratones infectados con los dos inóculos

parasitarios más altos. Así, en los ratones inoculados con 10^5 parásitos se observó que durante las dos primeras semanas de infección el 40-80 % de los campos examinados al microscopio no presentaban pérdida de folículos linfoides. Lógicamente, a medida que avanzaba el curso de la infección los campos examinados en los que no había depleción linfóide eran inferiores. Por tanto, la pérdida de folículos aumentaba hacia fases tardías de infección, siendo en su mayoría de tipo ligera en un 60 % de los campos analizados, mientras que la pérdida de folículos de tipo moderada (que iban acompañadas de un descenso en el número de células en los centros germinales) era menor y además no había pérdida de folículos de tipo severo. Es evidente que estos ratones lograron controlar la infección (Fig. 7. A). En cambio, en los ratones infectados con 10^6 parásitos (Fig. 7. B) el 100 % de campos analizados en fases tardías presentaban algún tipo de alteración. Prácticamente la mitad de las observaciones correspondían a pérdidas linfoides de grado ligero y la otra mitad de grado moderado. Además a los 56 días p. i. en el 15-20 % de los campos microscópicos se observaron pérdidas de folículos linfoides de tipo severo con signos característicos de necrosis como son la picnosis (retracción nuclear) y la cariorrhexis (fragmentación de la cromatina) en los núcleos de las células de los folículos. Estos resultados indican que los ratones infectados con 10^6 parásitos fueron incapaces de controlar la infección en bazo.

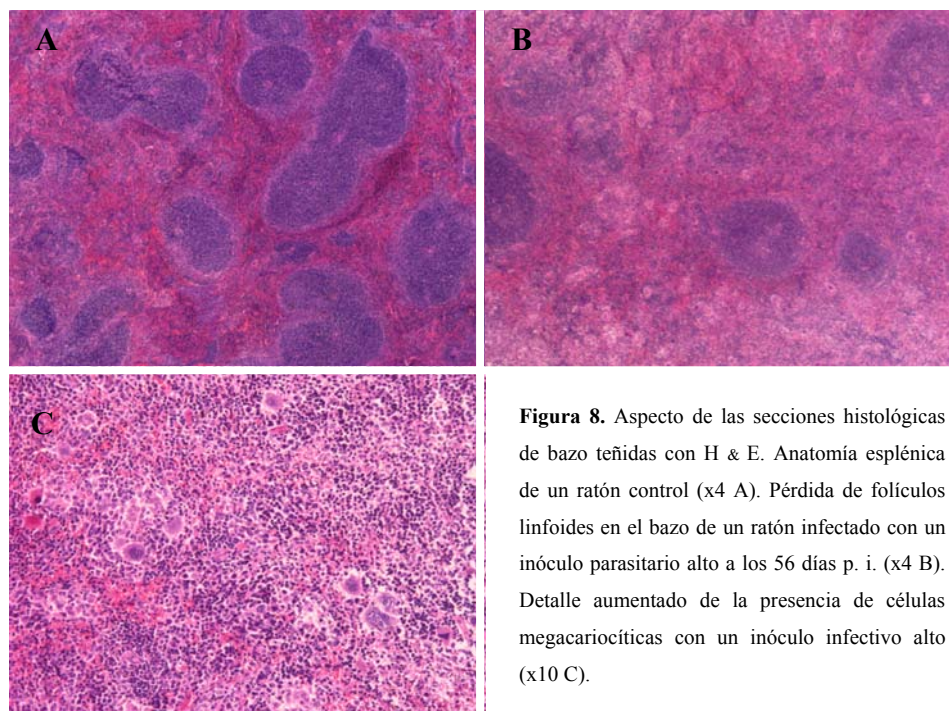


Figura 8. Aspecto de las secciones histológicas de bazo teñidas con H & E. Anatomía esplénica de un ratón control (x4 A). Pérdida de folículos linfoides en el bazo de un ratón infectado con un inóculo parasitario alto a los 56 días p. i. (x4 B). Detalle aumentado de la presencia de células megacariocíticas con un inóculo infectivo alto (x10 C).

En la figura 8 se observan las secciones histológicas de bazo de un ratón sin infectar y otro infectado con 10^6 parásitos. En los ratones control se observó una arquitectura esplénica intacta, mientras que en los infectados había una clara depleción linfóide después de 56 días p. i. En los ratones infectados con 10^6 parásitos, la depleción linfóide estaba acompañada de una abundante infiltración de megacariocitos como se observa al microscopio. En las secciones de hígado también pudieron observarse diferencias histológicas entre ambos grupos de infección. Los granulomas hepáticos eran de tamaño variable y en general estaban formados por células de Kupffer (infectadas o no con amastigotes), por algunas células epitelioides, por neutrófilos y por linfocitos reclutados que en conjunto constituían el núcleo del foco inflamatorio. También se observó en el hígado de algunos animales signos de hipertrofia e hiperplasia de las células de Kupffer y una discreta desorganización tisular con infiltraciones de células

inflamatorias mononucleares. La intensidad de estas lesiones varió durante el curso de la infección.

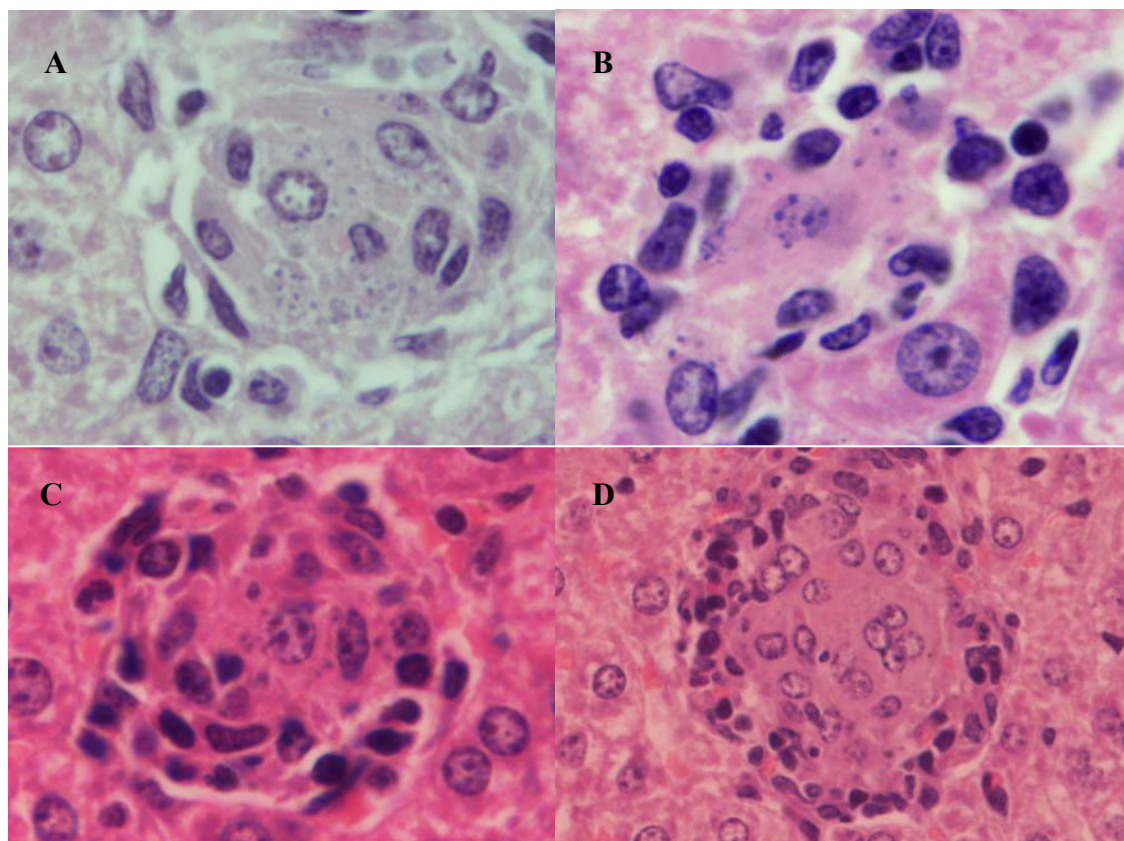


Figura 9. Detalles de los granulomas hepáticos. Granulomas inmaduro y maduro en ratones infectados con 10^6 parásitos a los 28 días p. i. (A) y a los 56 días p. i. (B). Granulomas maduro y estéril en ratones infectados con 10^5 parásitos a los 28 días p. i. (C) y a los 56 días p. i. (D). En todos los casos se emplearon aumentos $\times 100$.

En general, los granulomas fueron clasificados en función de su grado de madurez para eliminar los parásitos de *Leishmania*. De esta forma, pudimos distinguir entre granulomas todavía inmaduros, maduros con capacidad leishmanicida y finalmente granulomas estériles en los que se ya se habían eliminado los amastigotes del foco inflamatorio (Fig. 9. A-D).

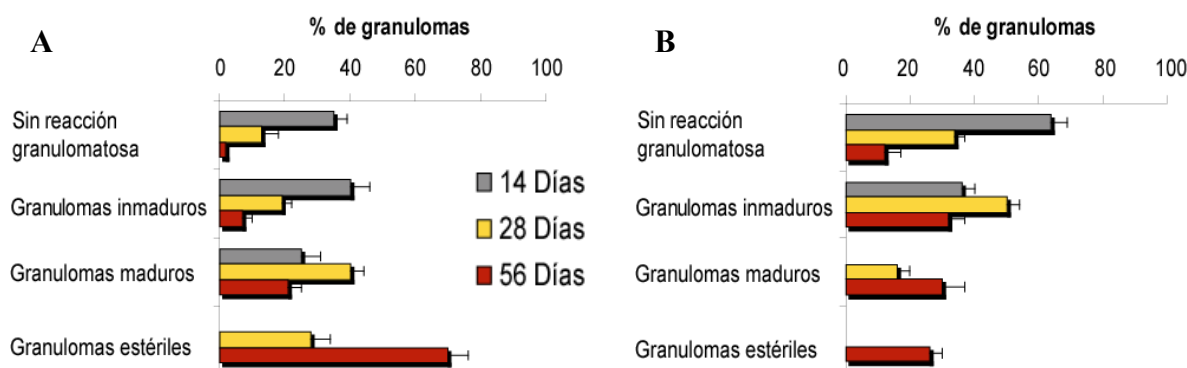


Figura 10. Porcentaje de granulomas hepáticos en sus diferentes fases de maduración en los ratones infectados con 10^5 (A) o 10^6 parásitos (B). Se identificaron al microscopio cincuenta núcleos infectados procedentes de cuatro ratones por grupo.

Los ratones infectados con 10^5 parásitos presentaron, desde fases tempranas de infección, un elevado número de infiltraciones inflamatorias que constituyeron granulomas. Esto conllevó una ligera patología en el parénquima hepático. Sin embargo, los granulomas maduraron progresivamente durante la infección alcanzando hasta en un 80 % su máxima capacidad leishmanicida.

A diferencia de lo que sucedió al infectar con el inóculo parasitario más alto, la resolución de la carga parasitaria en los ratones infectados con 10^5 parásitos estuvo asociada con la formación de granulomas de tipo maduro y estéril a los 56 días p. i. (Fig. 10. A). Como consecuencia de este hecho, se observó una disminución de los signos de patología en las secciones de hígado (Fig. 11). En cambio, en los ratones infectados con 10^6 parásitos se observó una disminución de la respuesta

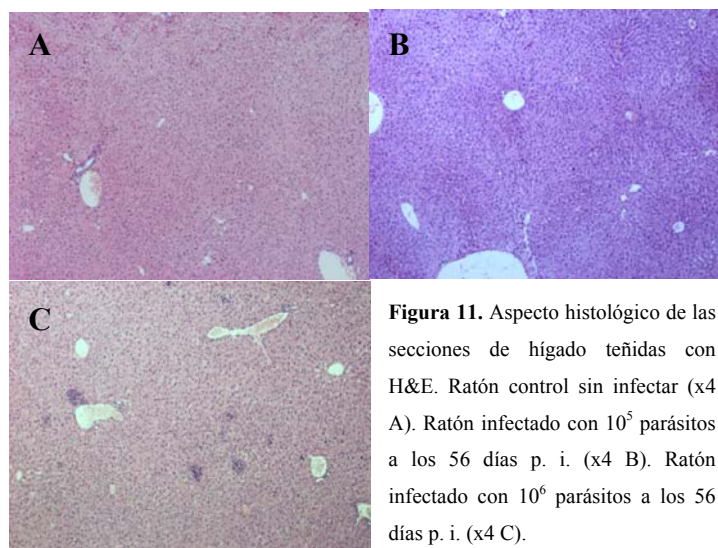


Figura 11. Aspecto histológico de las secciones de hígado teñidas con H&E. Ratón control sin infectar (x4 A). Ratón infectado con 10^5 parásitos a los 56 días p. i. (x4 B). Ratón infectado con 10^6 parásitos a los 56 días p. i. (x4 C).

proinflamatoria encaminada a la formación de granulomas como indica el hecho de que a los 14 días p. i. más del 60 % de los focos inflamatorios analizados al microscopio permanecían sin signos de reacción de tipo granulomatosa. Por tanto, en estas condiciones se observó un retraso inicial de la respuesta granulomatosa. Además, durante la progresión de la infección los granulomas mostraron dificultad para madurar y adquirir su capacidad leishmanicida. De esta forma, a los 56 días p. i. cerca del 40 % de los granulomas se estancaron en su fase inmadura (Fig. 10. B). Finalmente, solo un 25 % de los granulomas alcanzaron su fase estéril. Esto concuerda con la incapacidad de los ratones infectados con 10^6 parásitos de eliminar los parásitos en las fases tardías de infección y con la consecuente persistencia de la patología hepática asociada (Fig. 11. C).

4.2. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LC

El fenotipo mieloide de activación de las CD ($B220^-$, $CD8^-$, $CD11c^+$, $CD40^+$, $CD80^+$, $CD86^+$) fue confirmado por citometría de flujo después de 7 días de cultivo (datos no mostrados). Un mes después de la administración intravenosa de PBS (grupo control), CD-CpG, CD-Lm, CD-LmCpG, CD-HIS o CD-HISCpG, los ratones BALB/c fueron inoculados por vía intradérmica en cada una de las orejas con 1000 promastigotes metacíclicos de *L. major*. En un estudio preeliminar la administración de CD sin cargar tenía el mismo efecto tras la infección en ratones BALB/c que los controles de infección. Es por ello que en este ensayo no se reprodujo este grupo de vacunación.

4.2.1. Progresión de las lesiones después de la primera infección

El curso de la infección se monitorizó semanalmente midiendo la lesión dérmica que aparecía en el punto de inoculación en la oreja (Fig. 12. A). Las vacunaciones con CD cargadas con -LmCpG, -HIS o -HISCpG confirieron a los ratones un control de la infección como pone de manifiesto el pequeño tamaño de las lesiones dérmicas ($P < 0.05$) que aparecieron en las orejas después de 10 semanas p. i. En cambio, los ratones vacunados con CD cargadas con -CpG o -Lm desarrollaron lesiones en las orejas similares a las que presentaban los ratones control, alcanzando hasta 6 mm de diámetro.

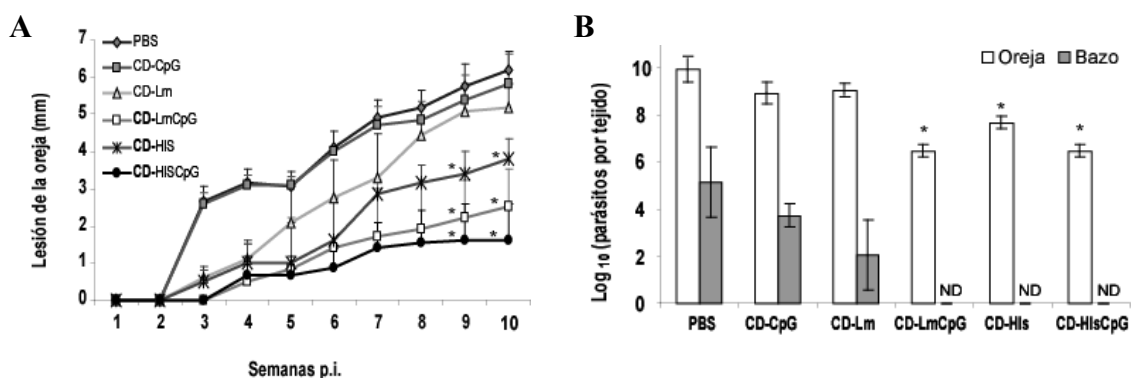


Figura 12. La progresión de la infección con *L. major* en los ratones BALB/c se monitorizó midiendo el diámetro de la lesión dérmica de la oreja (A). Las cargas parasitarias en la oreja y el bazo se estimaron mediante dilución límite a las 10 semanas p. i. (B). ND: no se detectaron parásitos. Los asteriscos indican el valor de p ($* P < 0.05$) con respecto a los ratones control. Los resultados representan la media y desviación estándar de ratones procedentes de dos experimentos independientes.

La cantidad de parásitos en la oreja y el bazo tras 10 semanas p. i. (Fig. 12. B) concuerda con los resultados anteriores y nos permitió diferenciar entre dos grupos de ratones vacunados. Por un lado, en los ratones que habían sido vacunados con CD-LmCpG, -HIS o -HISCpG no se observó la visceralización esplénica de los parásitos. Además, estos ratones presentaron unas cargas parasitarias en la oreja significativamente menores ($P < 0.05$) que el grupo control. Por otro lado, los ratones que habían sido vacunados con CD cargadas con -CpG o con -Lm presentaron cargas parasitarias, tanto en las orejas como en el bazo, similares a las observadas en los ratones control. A diferencia de la vacunación con CD-Lm, la administración del antígeno leishmanial en presencia de CpG confirió a los ratones BALB/c el control frente a la infección por *L. major*, en consonancia con otros estudios de inmunización con LmCpG (Ramírez-Pineda & col., 2004; Rhee & col., 2002).

4.2.2. Control a largo plazo de la reinfección cutánea

Con el objeto de determinar si los ratones protegidos que habían resistido la primera infección (CD-LmCpG, -HIS y -HISCpG) eran capaces de desarrollar una memoria inmunológica eficaz para controlar una segunda infección, fueron re infectados con 2000 promastigotes metacíclicos de *L. major* en la almohadilla plantar derecha. Como control de la infección se inoculó un grupo de ratones ($n = 4$) de forma similar.

A lo largo de 10 semanas desde la reinfección, en el 50 % de los ratones vacunados con CD-HISCpG no se detectaron lesiones en la almohadilla plantar (Fig. 13. A) y en el resto

de ratones del mismo grupo se observaron pequeñas lesiones. Posteriormente, hicimos un seguimiento del curso de la reinfección en un nuevo grupo de ratones ($n = 4$) vacunados con CD-HISCpG durante un periodo de 20 semanas. Tras la segunda infección, en algunos casos los animales no desarrollaron lesiones y en otros casos las lesiones fueron de pequeño tamaño pero sin signos de ulceración o necrosis. Sin embargo, se observó una ligera reactivación de la lesión en el sitio de infección primaria (< 3 mm de diámetro de la lesión en la oreja). Esto concuerda con trabajos de otros autores (Mendez & col., 2004).

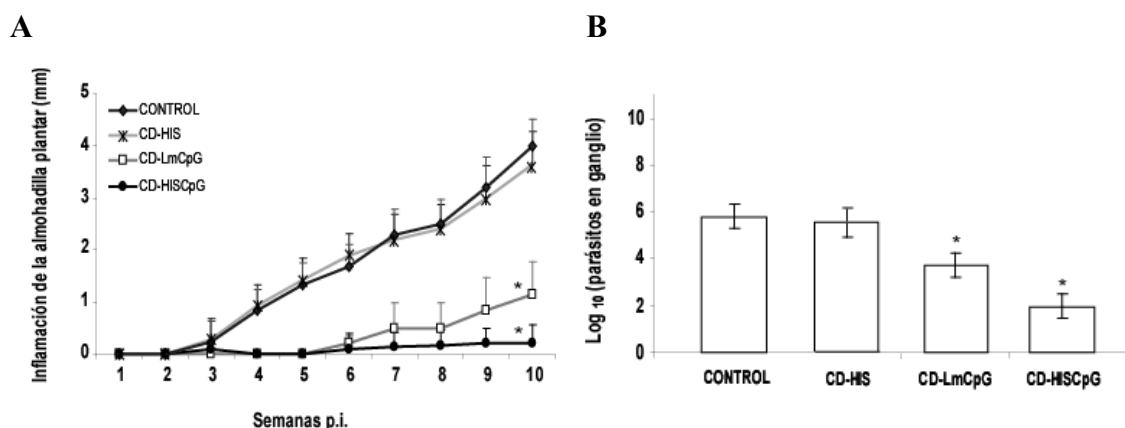


Figura 13. Progresión de la inflamación de la almohadilla plantar tras la reinfección de los ratones protegidos (A). Las cargas parasitarias en ganglio poplíteo fueron determinadas mediante dilución límite después de 10 semanas de reinfección (B). Los asteriscos indican el valor de p ($* P < 0.05$) con respecto a los ratones control. Los resultados representan la media y desviación estándar de ratones procedentes de dos experimentos independientes.

En todos los ratones vacunados con CD-LmCpG se observaron lesiones en la almohadilla plantar aunque también eran de tamaño muy pequeño. En cambio, los ratones vacunados con CD-HIS desarrollaron inflamaciones en la almohadilla plantar similares a las del grupo control. En comparación con el resto de grupos re infectados, los ratones vacunados con CD-HISCpG presentaron una carga parasitaria en ganglio poplíteo (Fig. 13. B) significativamente menor ($P < 0.05$), en concordancia con las diferencias que se habían observado en la inflamación de la almohadilla plantar. Por tanto, estos resultados indican que una sola inmunización con CD-LmCpG- o -HISCpG en ratones BALB/c confiere un control a largo plazo frente a la infección con *L. major*, siendo la vacunación con la mezcla de histonas en presencia de motivos CpG la más efectiva. En cambio, el control que confiere la vacunación con CD-HIS frente a la primera infección con los parásitos de *L. major* no es suficientemente duradero como para proteger a los ratones frente a una segunda infección.

4.2.3. El control frente a la infección por *L. major* se correlaciona con la inducción de una respuesta Th1 específica y una restricción de la respuesta Th2 específica

Estudios recientes han correlacionado los altos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras CD80 en la superficie de células presentadoras de antígeno con respuestas de tipo celular Th1 (Antoine & col., 2004). En cambio, una expresión preferente de CD86 parece estar asociada con la inducción de respuestas susceptibles de tipo Th2 (Brown & col., 2002; Brown & col., 1996; Elloso & Scott, 1999). En los ganglios maxilares se analizó por citometría la expresión de CD80 y CD86 sobre las células CD11c⁺ a las 10 semanas p. i. Se

observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la expresión de CD80 en relación con CD86 sobre las células CD11c⁺ de los ratones vacunados con CD-LmCpG o -HISCpG comparado con el resto de grupos (Fig. 14).

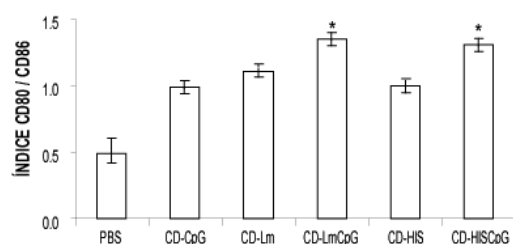


Figura 14. El índice CD80 / CD86 se ha calculado por citometría a partir de los datos de expresión de estas moléculas coestimuladoras en células CD11c⁺ de ganglios maxilares. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los ratones vacunados y los controles (* $P < 0.05$).

También, mediante citometría de flujo se detectó que los ratones vacunados con CD-LmCpG, -HIS o -HISCpG presentaban porcentajes de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN- γ más altos que los ratones control o los vacunados con CD-Lm (Fig. 15. A-B). Por otro lado, los ratones vacunados con CD-LmCpG o -HISCpG mostraron los porcentajes más bajos de células productoras de IL-4 (Fig. 15. C).

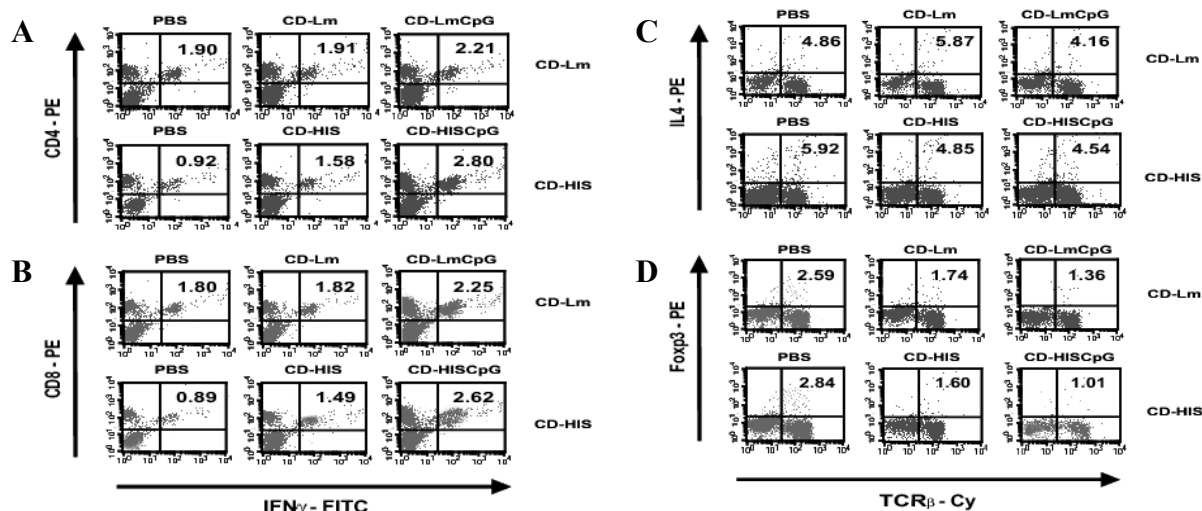


Figura 15. Análisis citométrico de las células de ganglio maxilar estimuladas in vitro con CD cargadas con -Lm o -HIS a las 10 semanas p.i. Porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ (A-B). Porcentaje de células T productoras de IL-4 (C) o que expresan foxp3 (D). Los datos representan valores medios de dos experimentos independientes.

Además, se observó un notable descenso del porcentaje de células T foxp3⁺ en los ratones vacunados con CD-LmCpG e -HISCpG (Fig. 15. D). Hay que señalar que las células Treg foxp3⁺ observadas en los ganglios maxilares eran Ag-específicas (Lm o HIS) ya que sólo fueron detectadas tras la estimulación in vitro con CD-Lm o -HIS.

También, se analizó la producción de citoquinas en ganglios maxilares tras la estimulación in vitro con CD vacías o CD-Lm (Fig. 16. A-C). La producción específica de IFN- γ fue mayor en los linfocitos de todos los grupos de vacunación (excepto en el grupo vacunado con CD-Lm) comparada con el grupo control. La producción de citoquinas-Th2 (IL-10 e IL-4) fue significativamente menor ($P < 0.05$) en los ganglios maxilares de ratones vacunados con CD-LmCpG o -HISCpG. Los valores más elevados del ratio IFN- γ /IL-10 se observaron en los ratones que habían sido vacunados con CD-LmCpG o -HISCpG (6.62 ± 0.38 y 7.55 ± 0.34 , respectivamente). En cambio, los ratios IFN- γ /IL-10 más bajos se detectaron en los controles y los ratones vacunados con CD-CpG (2.22 ± 0.50 y 3.05 ± 0.48 , respectivamente).

En conjunto, los resultados sugieren que el control frente a la infección con *L. major* en los grupos de ratones vacunados con CD-LmCpG, -HIS e -HISCpG es dependiente de la generación de una respuesta Th1 específica y de la restricción de la respuesta de tipo Th2.

4.2.4. Respuesta humoral

En el modelo murino de LC, las respuestas inmunitarias resistentes de tipo Th1 se correlacionan con unos niveles predominantes de anticuerpos IgG2a específicos del parásito, mientras que un predominio de anticuerpos IgG1 están asociados con respuestas de tipo Th2 (Coffman & col., 1993) que conducen a un fenotipo susceptible. Hemos analizado la respuesta humoral después de 10 semanas desde la infección de los ratones con *L. major* (Fig. 17. A). Los ratones vacunados con CD-Lm desarrollaron una respuesta humoral parásito-específica de tipo Th2 similar a la de los controles. Sin embargo, la misma formulación en presencia de CpG indujo un aumento relativo de anticuerpos IgG2a anti-SLA. La vacunación con CD-HIS o CD-CpG promovió unos títulos humorales de una intensidad similar entre los isotipos IgG1 e IgG2a anti-SLA. En los ratones vacunados con CD-HISCpG también se observó una respuesta humoral anti-SLA de tipo mixta pero con títulos ligeramente más bajos.

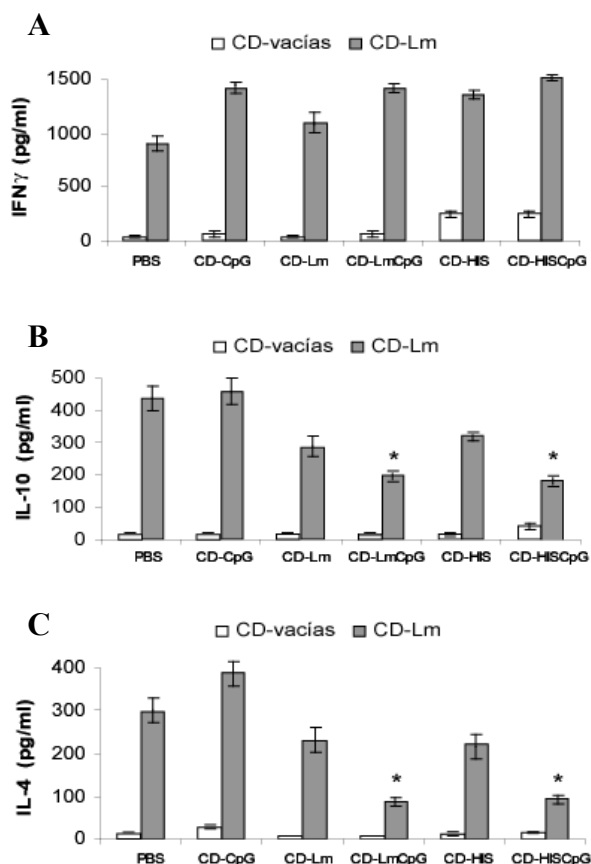


Figura 16. Producción de citoquinas a las 10 semanas p.i. Los niveles de las citoquinas IFN- γ (A), IL-10 (B) e IL-4 (C) fueron estimados mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo de los ganglios maxilares después de 48 h desde la estimulación in vitro con CD vacías o cargadas con *L. major*. Los datos son medias \pm desviaciones estándar de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los ratones vacunados y los controles (* $P < 0.05$).

Por otro lado, se analizó la respuesta humoral específica contra la mezcla de las cuatro histonas recombinantes del parásito en los grupos vacunados con CD-HIS e -HISCpG y en el grupo control tras la infección con *L. major* (Fig. 17. B). Mientras que los anticuerpos anti-histonas en los ratones control fueron del isotipo IgG1 de forma mayoritaria, en los ratones vacunados con CD-HIS e -HISCpG se detectaron títulos similares de IgG2a e IgG1 anti-histonas. Los niveles del isotipo IgG2a fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) que los del grupo control. Es interesante destacar que al igual que sucedía con los anticuerpos anti-SLA, la vacunación con CD-HISCpG restringió la respuesta humoral anti-histonas en comparación con los ratones vacunados con la misma formulación en ausencia de CpG.

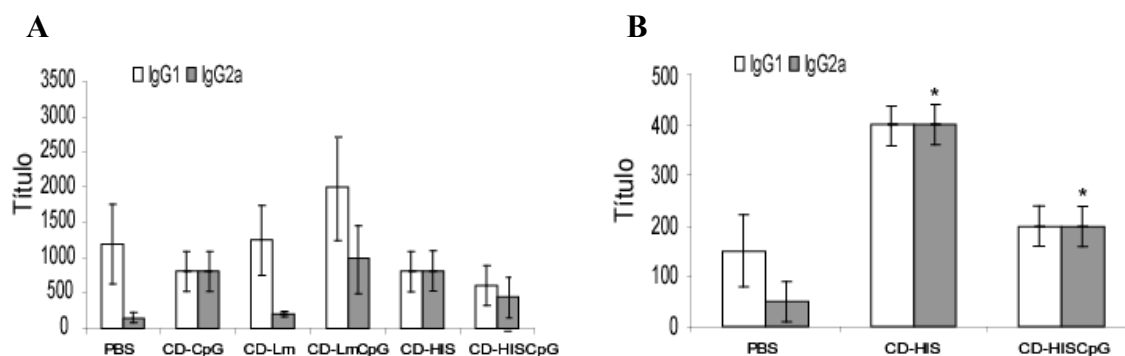


Figura 17. Análisis de la respuesta humoral inducida en los ratones BALB/c. A las 10 semanas desde la infección con *L. major* fue extraído suero de todos los grupos de ratones ($n = 8$) para detectar anticuerpos anti-SLA (A) o anti-histonas (B) mediante ELISA. Se determinaron los títulos de los isotipos IgG1 e IgG2a. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los ratones vacunados y los controles (* $P < 0.05$).

4.2.5. Actividad arginasa

Como ya han descrito otros autores (Inieta & col., 2001), existe una asociación entre el crecimiento intracelular de *Leishmania* y la actividad arginasa que se induce en el bazo de los ratones infectados. Por tanto, se analizó la actividad arginasa en las SPMC a la semana 10 p. i. (Fig. 18). Después de la estimulación *in vitro* de las células SPMC con SLA, se detectaron los niveles más bajos de actividad arginasa ($P < 0.05$) en los ratones que habían sido vacunados con CD-LmCpG e -HISCpG.

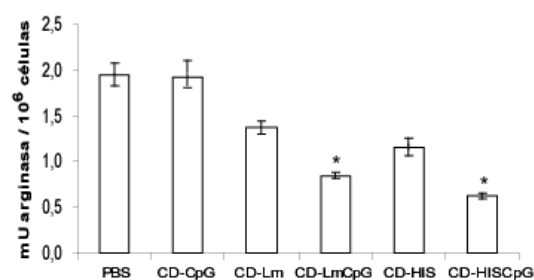


Figura 18. Actividad arginasa en bazo. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los ratones vacunados y los controles (* $P < 0.05$).

4.2.6. Estudio histológico y aspecto de las lesiones

Como se ha indicado con anterioridad, las lesiones dérmicas en los sitios de infección primaria (orejas) que presentaban los ratones vacunados con CD-LmCpG e -HISCpG fueron de tamaño muy pequeño y sin signos de patología después de 10 semanas p. i. En cambio, los ratones vacunados con CD-HIS desarrollaron unas lesiones de tamaño ligeramente superior a estos anteriores aunque inferiores a los 5 mm de inflamación que en promedio presentaron los grupos vacunados con CD-CpG o CD-Lm y los ratones control (Fig. 19).

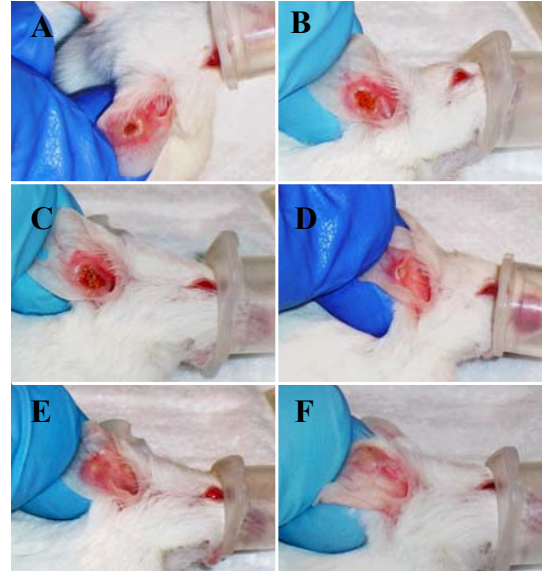


Figura 19. Lesiones en las orejas a la semana 10 p. i. Ratones control (A), vacunados con DC-CpG (B), DC-Lm (C), DC-LmCpG (D), DC-HIS (E) y DC-HISCpG (F). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano durante la medición



Figura 20. Aspecto de las lesiones en las almohadillas plantares después de 10 semanas de infección en los ratones control (A), y de 10 semanas de reinfección en el caso de los ratones vacunados con DC-HIS (B), DC-LmCpG (C) y DC-HISCpG (D).

Por otro lado, la mitad de los ratones del grupo DC-HISCpG desarrollaron inflamaciones de sólo 0,5 mm, mientras que la otra mitad no desarrolló inflamación en las almohadillas plantares. Sin embargo, las lesiones en las almohadillas plantares de los ratones vacunados con CD-HIS (3,5 mm) fueron similares a las que presentaron los ratones control (4 mm).

El estudio histopatológico de las almohadillas plantares (Fig. 21) determinó, en el grupo control, la presencia de una inflamación granulomatosa severa, caracterizada por la acumulación en la dermis de linfocitos y macrófagos con amastigotes en su interior. Los infiltrados de células inflamatorias alcanzaron en profundidad áreas de cartílago y hueso. En la epidermis se observaron extensas áreas de necrosis y ulceración con la presencia de neutrófilos y macrófagos infectados en los granulomas.

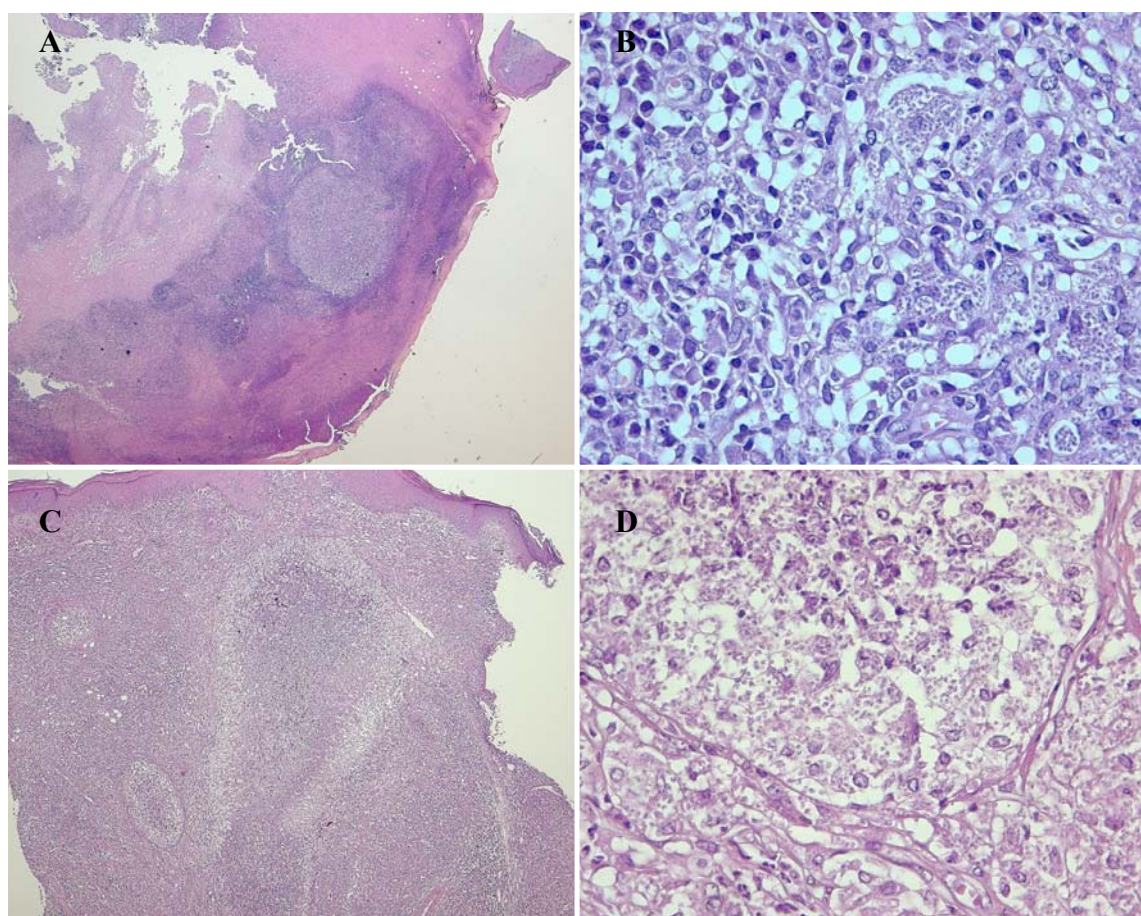


Figura 21. Estudio histológico de las lesiones en las almohadillas plantares teñidas con H&E. Inflamación granulomatosa severa con necrosis y ulceración de la epidermis (x50 A) y presencia de parásitos en el interior de los macrófagos (x630 B) en ratones control. Características de la inflamación (x50 C) y de la presencia de parásitos (x630 D) en el grupo DC-HIS.

Las características histológicas de las secciones de almohadilla plantar de los ratones vacunados con CD-HIS fueron similares a las del grupo control. En el grupo vacunado con DC-LmCpG se detectó una moderada infiltración inflamatoria con algunos macrófagos infectados en la dermis (Fig. 22. A-B). En cambio, el tamaño de los granulomas disminuyó en los sitios de infección secundaria de los ratones vacunados con CD-HISCpG. Además, en estos ratones se observó una arquitectura epidérmica sin ulceraciones y una infiltración

inflamatoria moderada en la dermis y capa muscular, pero en ausencia de macrófagos infectados (Fig. 22. C-D).

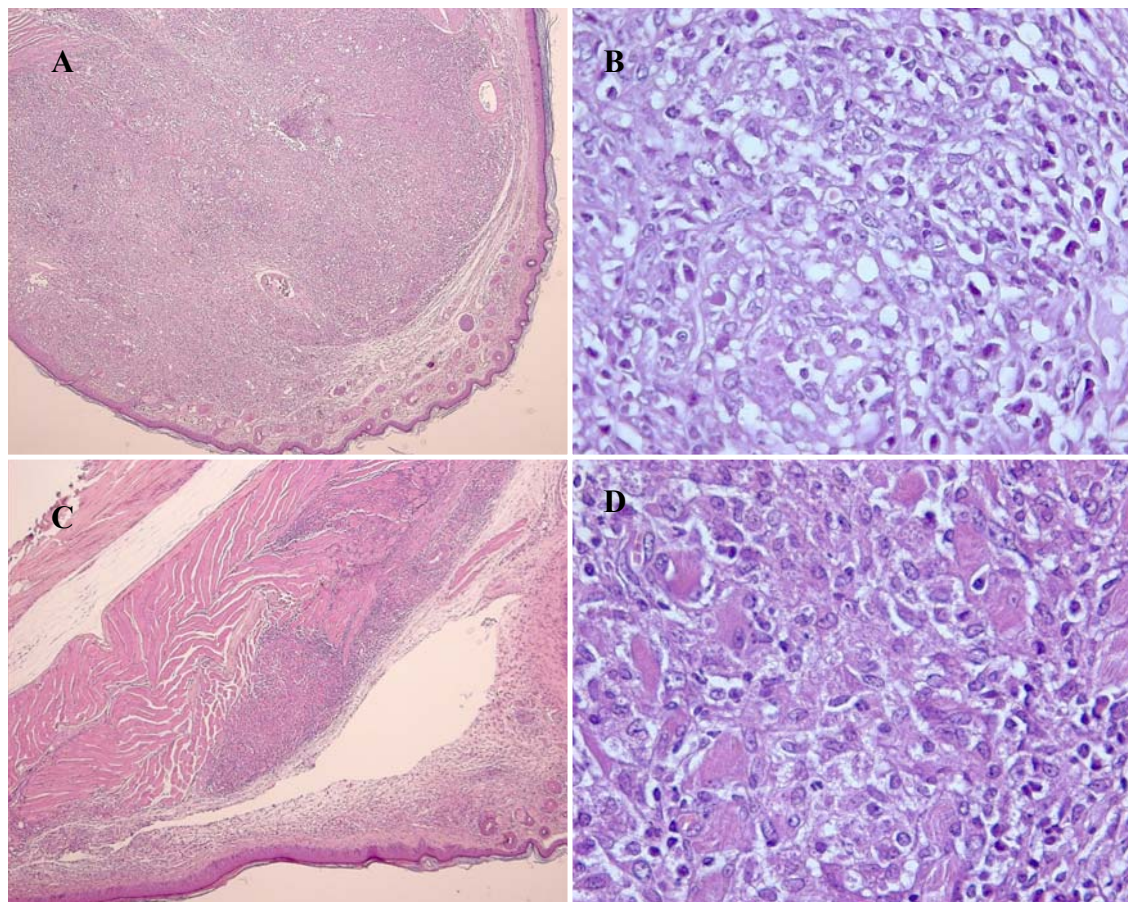


Figura 22. Estudio histológico de las lesiones en las almohadillas plantares teñidas con H&E. Ligera inflamación granulomatosa en la epidermis (x50 A) y escasa presencia de parásitos en la dermis (x630 B) en los ratones vacunados con CD-LmCpG. Infiltrado inflamatorio débil en la dermis y capa muscular (x50 C) y escaso infiltrado de linfocitos sin macrófagos infectados (x630 D) en los ratones vacunados con DC-HISCpG.

4.3. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LV

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2., un mes después de la administración intravenosa de PBS (grupo control), CD-vacías, CD-CpG, CD-HIS o CD-HISCpG, los ratones BALB/c fueron inoculados por vía intravenosa en la vena lateral de la cola con 10^5 promastigotes estacionarios de *L. infantum*. Como este ensayo de vacunación frente a LV era la primera vez que se realizaba se incluyó un grupo de ratones vacunados con CD sin cargar.

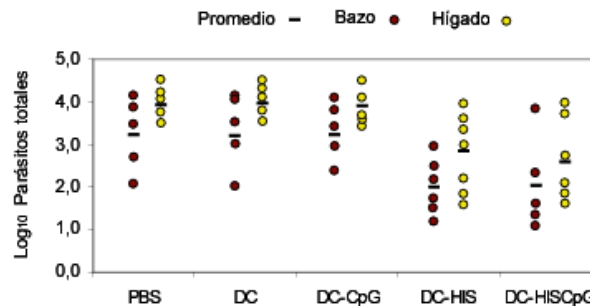


Figura 23. Estimación de la carga parasitaria en bazo y en hígado a la semana 4 p. i. Cada punto representa un ratón mientras que el promedio de cada grupo está representado por un segmento.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a las 4 semanas p. i. ya que este es un periodo de tiempo suficiente como para que se haya establecido la infección en bazo e hígado. Según los resultados del apartado 4. 1. en el hígado no se alcanza la esterilidad parasitaria después de 4 semanas desde la infección con 10^5 promastigotes.

4.3.1. Determinación de las cargas parasitarias

En la figura 23 se observan las cargas parasitarias en bazo e hígado de cada uno de los ratones de los distintos grupos de vacunación. Aunque estadísticamente los promedios de las cargas parasitarias en bazo e hígado de los ratones vacunados y no vacunados no presentan diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$), cuando se analiza la cantidad de parásitos en cada uno de ellos de forma individual se observa que en el 50 % de los ratones de los grupos vacunados con CD-HIS o -HISCpG se produjo en bazo y en hígado una reducción parasitaria en relación a los ratones control. La administración de CD o CD-CpG no promovió en ratón una respuesta inmunitaria eficaz frente a LV. De hecho, estos ratones presentaron unas cargas parasitarias en bazo e hígado similares a las que se detectaron en los ratones control.

4.3.2. Atenuación de la respuesta de susceptibilidad frente a LV

En la figura (Fig. 24) se muestra que la cantidad media de IFN- γ parásito-específica detectada en bazo fue mayor en los ratones vacunados con CD-HIS o -HISCpG, aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$) con respecto a los controles. Los niveles de IL-10 parásito-específicos fueron más elevados en los ratones vacunados con CD-HIS o -HISCpG. Esto determinó que el índice IFN- γ /IL-10 fuera similar entre los distintos grupos de ratones.

Los datos de citometría de flujo de las células esplénicas (Tabla II) indicaron que no existían variaciones entre los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y linfocitos T productores de IFN- γ , caracterizados por los correspondientes perfiles fenotípicos: TCR- β^+ , CD19 $^+$ y TCR- β^+ IFN- γ^+ . En los ratones vacunados con CD-HIS o -HISCpG se observó, en sus células presentadoras de antígeno CD11 $^+$, un ligero aumento de la expresión en superficie de CD40 $^+$, CD80 $^+$ y CD86 $^+$ en relación a los ratones control. Sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo ($P > 0.05$). En cambio, se detectó un descenso significativo ($P < 0.05$) en el porcentaje de células T Foxp3 $^+$ en los bazos procedentes de los ratones que habían sido vacunados con CD-HIS o -HISCpG. De hecho, esto explica un aumento significativo ($P < 0.05$) del cociente entre células T efectoras y células Treg en estos ratones.

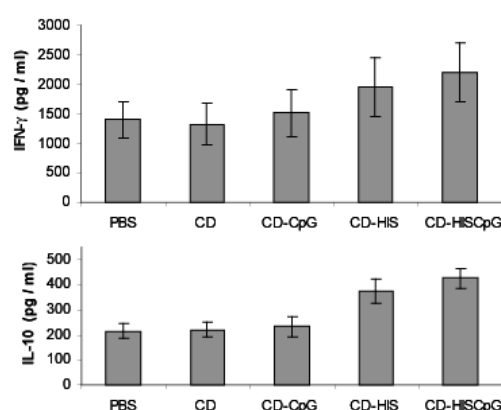


Figura 24. Producción de citoquinas a la semana 4 p. i. Los niveles esplénicos de IFN- γ y de IL-10 fueron determinados mediante ELISA después de 48 h desde la estimulación in vitro con SLA. Se representan las medias \pm desviaciones estándar de los ratones de cada grupo (n = 8).

Los análisis de respuesta humoral (Fig. 24) mostraron una producción similar de anticuerpos IgG1 anti-SLA entre los distintos grupos de ratones, mientras que los ratones vacunados con CD-HIS o -HISCpG presentaron mayores títulos de anticuerpos del isotipo IgG2a en comparación a los ratones control.

	PBS	CD-HIS	CD-HISCpG
TCR- β ⁺ IFN- γ ⁺	11,60	12,30	12,70
TCR- β ⁺ Foxp3 ⁺	8,88	6,25 *	5,25 *
TCR- β ⁺	43,00	42,80	42,30
CD19 ⁺	40,80	39,05	42,35
CD11c ⁺ CD40 ⁺	1,57	1,78	1,83
CD11c ⁺ CD80 ⁺	2,08	2,38	2,46
CD11c ⁺ CD86 ⁺	2,10	2,35	2,31
Tefectoras / Treg	1,31	1,97 *	2,42 *

Tabla II. Porcentajes de las poblaciones celulares esplénicas analizadas mediante citometría de flujo. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas (* $P < 0.05$) entre los ratones vacunados y los controles. Se muestran los valores promedio de cada grupo (n = 8).

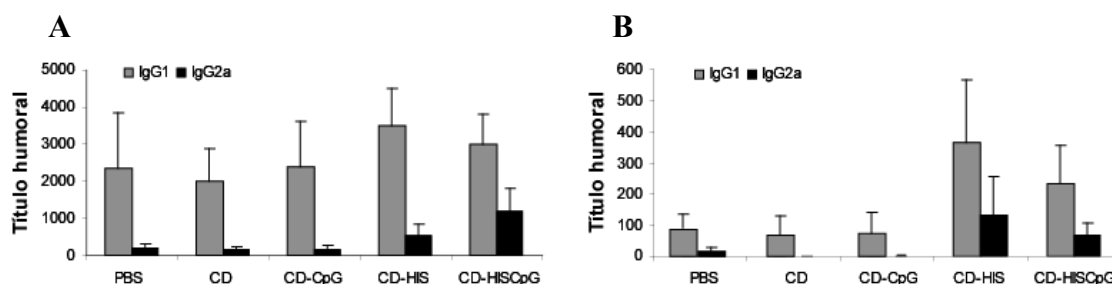


Figura 25. Respuesta humoral en los ratones después de 1 mes p. i. Detección de anticuerpos anti-SLA (A) o anti-histonas (B). En todos los casos se determinaron los isotipos IgG1 e IgG2a. Se representan los valores promedio \pm las desviaciones estándar de cada grupo (n = 8).

Por otro lado, se detectaron anticuerpos anti-HIS en los ratones vacunados con CD-HIS o -HISCpG, con un perfil mixto IgG1/IgG2a, mientras que en los grupos control los anticuerpos frente a HIS presentaron unos niveles prácticamente basales.

4.4. Obtención de las proteínas recombinantes y de las construcciones genéticas realizadas con las histonas de *Leishmania*

A continuación se detallan los Ag recombinantes de *Leishmania* que fueron obtenidos, así como las construcciones genéticas que se llevaron a cabo con el objetivo de medir su capacidad para dirigir la respuesta inmunitaria en los respectivos ensayos de vacunación frente a leishmaniosis.

4.4.1. Purificación de las proteínas recombinantes histonas de *Leishmania*

Las cuatro histonas de *L. infantum* (H2A, H2B, H3 y H4) expresadas en *E. coli* como proteínas recombinantes fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad siguiendo la metodología anteriormente descrita en materiales y métodos. La figura 26. A muestra un gel SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida (10-15%) teñido con azul de Coomassie tras la purificación de las proteínas recombinantes: H2A (13,2 KDa), H2B (11 KDa), H3 (13 KDa), y H4 (10 KDa). Igualmente, las cuatro histonas expresadas en *E. coli* como proteínas fusionadas a MBP, fueron separadas en un gel SDS-PAGE como muestra la figura 26. B, confirmando la purificación de MBP-H2A (53 KDa), MBP-H2B (51 KDa), MBP-H3 (53 KDa) y MBP-H4 (50 KDa).

4.4.2. Construcción de los plásmidos recombinantes

Los insertos de cada una de las cuatro histonas de *L. infantum* fueron amplificados por PCR. Las secuencias de los cebadores específicos para H2A y H2B se diseñaron incluyendo un codón de inicio ATG, mientras que para H3 y H4 se incluyó un codón de terminación.

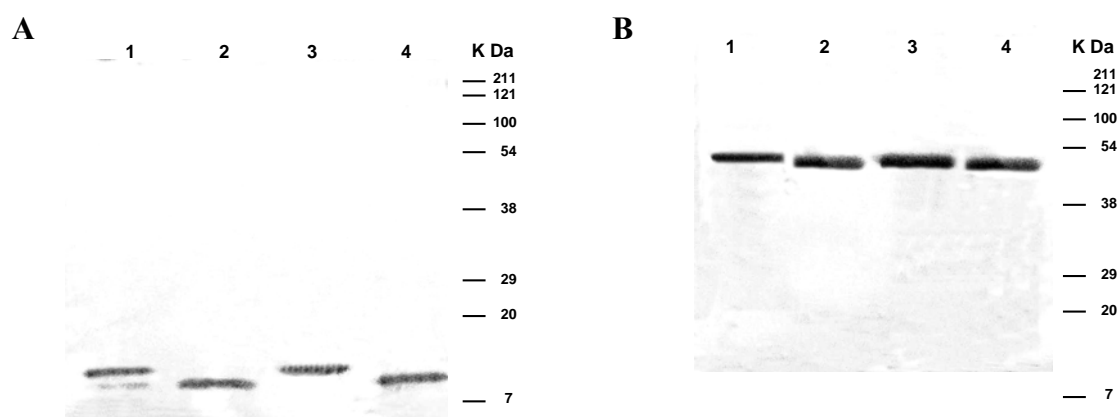


Figura 26. Geles de SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 10-15 % teñidos con azul de Coomassie. Panel A: Purificación de las proteínas histonas de *L. infantum* expresadas en *E. coli*. H2A (carril 1), H2B (carril 2), H3 (carril 3), H4 (carril 4). Panel B: Purificación de las proteínas histonas unidas a MBP expresadas en *E. coli*. MBP-H2A (carril 1), MBP-H2B (carril 2), MBP-H3 (carril 3), MBP-H4 (carril 4). Se muestran los marcadores de peso molecular en KDa.

Como moldes se emplearon los clones obtenidos anteriormente en el laboratorio: pcDNA3-LiH2A, pcDNA3-LiH2B, pcDNA3-LiH3, pcDNA3-LiH4 (Iborra & col., 2004). Los productos de la amplificación fueron primeramente clonados en el vector pBluescript II Ks-, secuenciados para verificar la secuencia codificante, y finalmente clonados en el vector pcDNA3.

Como se observa en la Tabla III, después de las digestiones con *Bam* HI y *Eco* RI los ADN que codifican para H2A o para H2B fueron clonados de forma independiente entre las dianas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI del vector de expresión procariota pBluescript. De forma similar, después de digerir con *Eco* RI y *Xho* I los ADN que codifican para H3 o para H4 fueron clonados entre las dianas de restricción *Eco* RI y *Xho* I del vector pBluescript. A continuación, con los clones resultantes (pBlsH2AJC, pBlsH2BJC, pBlsH3JC y pBlsH4JC) se liberaron los insertos de cada una de las cuatro histonas con sus correspondientes dianas de restricción y se procedió a clonarlas en pcDNA3.

Finalmente, después de hacer las digestiones y ligaciones pertinentes se obtuvieron los siguientes clones recombinantes: pcDNA3H2AH3JC, pcDNA3H2BH4JC, pcDNA3H2AH4JC, pcDNA3H2BH3JC. Los ADN plasmídicos de estos clones fueron purificados mediante el kit comercial Giga-prep y más tarde se estudió su efecto en ratones BALB/c frente a LC y LV. Empleando los cebadores T7 (directo) y PRC 3' (reverso), se realizó la secuenciación que nos permitió verificar la secuencia completa de las construcciones.

Construcción	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso	Enzimas de restricción
pBluescript-H2A	5'-CGGGATCCATGGGCGC TACTCTCGCAGCGCCAA-3'	5'-GGAATTCCTCCGCGCT CGGTGTCGCCTGC-3'	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI
pBluescript-H2B	5'-CGGGATCCATGGGAGCCT CTTCTCGCTCTGCTCC-3'	5'-GGAATTCAGCCGACGC GCTCGACACGG-3'	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI
pBluescript-H3	5'-GGAATTCCTCCGCACCAA GGAGAC-3'	5'-CCGCTCGAGTTATCCGTG GCGCTACCGCGCAGGC-3'	<i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I
pBluescript-H4	5'-GGAATTCGGAGCCAAGG GCAAGCGTTCCAC-3'	5'-CCGCTCGAGTTACGCG TAGCCGTACAGGA-3'	<i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I

Tabla III. En esta tabla se muestran los vectores de expresión procariota obtenidos, la secuencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores directos y reversos, así como las dianas de restricción que se incluyeron en su diseño.

A continuación se muestran las respectivas secuencias de aminoácidos traducidos a partir de las construcciones genéticas (tabla IV).

pcDNA3H2AH3JC
Met G A T P R S A K K A A R K S G S K S A K C G L I F V G R V G G Met Met R R G Q Y A R R I G A S G A V Y L A A V L E Y L T A E L L E L S V K A A A Q S G K K R C R L N P R T V Met L A A R H D D D I G Met L L K N V T L S H S G V V P S V S K A V A K K K G G K K G R A T P S A G E F S R T K E T A R A K R T I T S K K S K K A P S G A S G V K R S H R R W R P G T C A I R E I R K F Q K S T S L L I Q C A P F Q R L V R E V S S A Q K E G L R F Q S S A I Met A L Q E A T E A Y I V S L Met A D T N L A C I H A K R V T I Q P K D I Q L A L R L R G E R H G Stop
pcDNA3H2BH4JC
Met G A S S R S A P R K A S H A H K S H R K P K R S W N V Y V G R S L K A I N A Q Met S Met S H R T Met S I V N S Y V N D V Met E R I C Met E A A S I V R A N K K R T L G A R E V Q T A V R I V L P A E L A K H A Met A E G T K A V S S A S A E F G A K G K R S T D A K S Q R R Q K K V L R D N I R G I T R G C V R R Met A R R G G V K R I S T E V Y E E V R R V L K A Y V E D I V R C S T A Y T E Y A R K K T V T A C D V V T A L R K Q G H I L Y G Y A Stop
pcDNA3 H2AH4JC
Met G A T P R S A K K A A R K S G S K S A K C G L I F V G R V G G Met Met R R G Q Y A R R I G A S G A V Y L A A V L E Y L T A E L L E L S V K A A A Q S G K K R C R L N P R T V Met L A A R H D D D I G Met L L K N V T L S H S G V V P S V S K A V A K K K G G K K G R A T P S A G E F G A K G K R S T D A K G S Q R R Q K K V L R D N I R G I T R G C V R R Met A R R G G V K R I S T E V Y E E V R R V L K A Y V E D I V R C S T A Y T E Y A R K K T V T A C D V V T A L R K Q G H I L Y G Y A Stop
pcDNA3 H2BH3JC
Met G A S S R S A P R K A S H A H K S H R K P K R S W N V Y V G R S L K A I N A Q Met S Met S H R T Met S I V N S Y V N D V Met E R I C Met E A A S I V R A N K K R T L G A R E V Q T A V R I V L P A E L A K H A Met A E G T K A V S S A S A E F S R T K E T A R A K R T I T S K K S K K A P S G A S G V K R S H R R W R P G T C A I R E I R K F Q K S T S L L I Q C A P F Q R L V R E V S S A Q K E G L R F Q S S A I Met A L Q E A T E A Y I V S L Met A D T N L A C I H A K R V T I Q P K D I Q L A L R L R G E R H G Stop

Tabla IV. Secuencias peptídicas traducidas de los plásmidos recombinantes pcDNA3H2AH3JC, pcDNA3H2BH4JC, pcDNA3H2AH4JC y pcDNA3H2BH3JC.

4.4.3. Expresión de las construcciones genéticas en células COS7

Con el objeto de analizar si los clones se expresaban en células eucariotas, se transfectaron células COS7 con los respectivos plásmidos recombinantes. Los resultados de Western blot verificaban que las cuatro combinaciones de histonas clonadas en pcDNA3 se

expresaban en células de mamífero (Fig. 27). Las bandas de 26, 23, 24 y 21 KDa se correspondían con los pesos moleculares de las respectivas proteínas: H2AH3, H2AH4, H2BH3 y H2BH4. La expresión de las histonas de *L. infantum* como proteínas recombinantes por separado ya había sido confirmada con anterioridad en el laboratorio (Iborra & col., 2004).

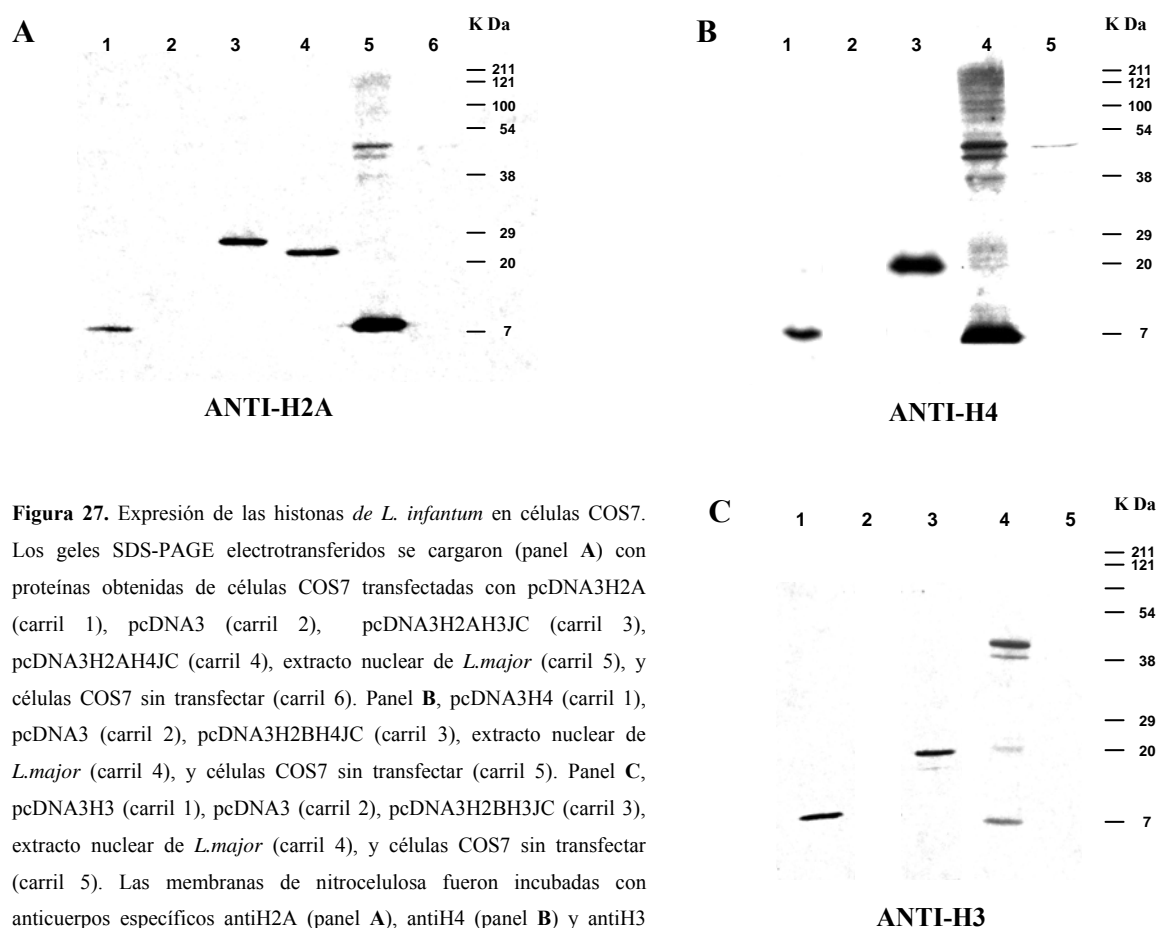


Figura 27. Expresión de las histonas de *L. infantum* en células COS7. Los geles SDS-PAGE electrotransferidos se cargaron (panel A) con proteínas obtenidas de células COS7 transfectadas con pcDNA3H2A (carril 1), pcDNA3 (carril 2), pcDNA3H2AH3JC (carril 3), pcDNA3H2AH4JC (carril 4), extracto nuclear de *L. major* (carril 5), y células COS7 sin transfectar (carril 6). Panel B, pcDNA3H4 (carril 1), pcDNA3 (carril 2), pcDNA3H2BH4JC (carril 3), extracto nuclear de *L. major* (carril 4), y células COS7 sin transfectar (carril 5). Panel C, pcDNA3H3 (carril 1), pcDNA3 (carril 2), pcDNA3H2BH3JC (carril 3), extracto nuclear de *L. major* (carril 4), y células COS7 sin transfectar (carril 5). Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con anticuerpos específicos antiH2A (panel A), antiH4 (panel B) y antiH3 (panel C) procedentes de una mezcla de sueros caninos leishmaniósicos.

4.5. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LC

En este ensayo frente a la infección por *L. major*, además de los grupos inmunizados con las construcciones genéticas dobles de las histonas (H2AH3, H2BH4, H2AH4 ó H2BH3), también se inocularon dos grupos de ratones (n = 4) como controles positivos de protección. Estos grupos fueron inmunizados con un cóctel compuesto por dos de las construcciones genéticas dobles (cóctel-1: H2AH3+H2BH4, cóctel-2: H2AH4+H2BH3). De esta forma se administraban en ratón las cuatro histonas que ya habían demostrado su capacidad protectora frente a LC (Iborra & col., 2004).

4.5.1. Progresión de las lesiones y de las cargas parasitarias después de la primera infección

La medición de la inflamación en la almohadilla plantar de los ratones durante el curso de la infección con *L. major* (Fig. 28), puso de manifiesto el establecimiento de tres tipos de respuesta inmunitaria. Los grupos que habían sido inmunizados con el vector vacío o con PBS desarrollaron inflamaciones de unos 4 mm en el sitio de infección acompañadas de signos intensos de ulceración y necrosis después de 7 semanas p. i. Por consiguiente, estos ratones fueron incapaces de controlar la infección. Los grupos inmunizados con los cócteles genéticos completos con las cuatro histonas (cóctel-1 o cóctel-2), desarrollaron inflamaciones inferiores a 1,5 mm ($P < 0.05$) en las almohadillas plantares después de 7 semanas p. i. y adquirieron una respuesta inmunitaria resistente a la infección cutánea. Por otro lado, la administración de cada una de las construcciones genéticas que contenían dos histonas indujo respuestas parcialmente resistentes a la infección como demuestra el menor grado de las inflamaciones durante las 6 semanas p. i. ($P < 0.05$) en relación a los controles. Sin embargo, los ratones vacunados con las construcciones genéticas parciales perdieron el control de la infección después de 7 semanas y desarrollaron inflamaciones en el sitio de infección similares a las que presentaron los controles aunque los signos de ulceración y necrosis fueron menos patentes. Estos resultados indican que las inmunizaciones parciales con dos histonas promovieron un retraso de la enfermedad. De hecho, el aspecto de las lesiones en el sitio de infección a la semana 6 p. i. muestra que todos los grupos inmunizados con dos o con las cuatro histonas controlan el desarrollo de la inflamación en comparación con los grupos control (Fig. 29).

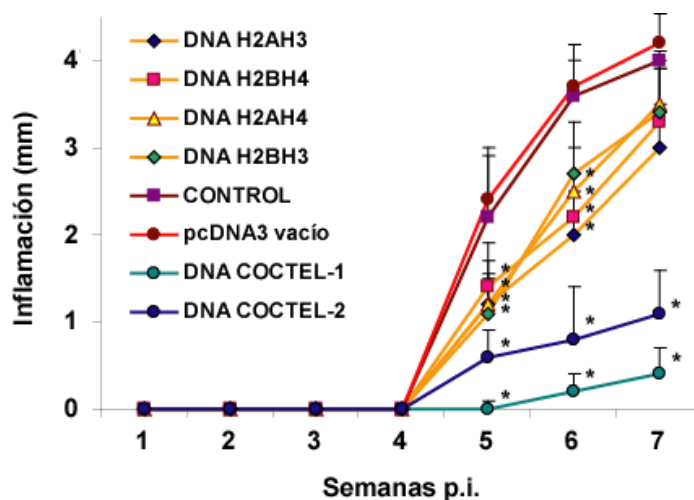


Figura 28. Progresión de las lesiones en la almohadilla plantar tras la infección con *L. major*. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.05$) con respecto a los ratones control. Los resultados representan la media y desviación estándar de cada grupo de ratones ($n = 8$).

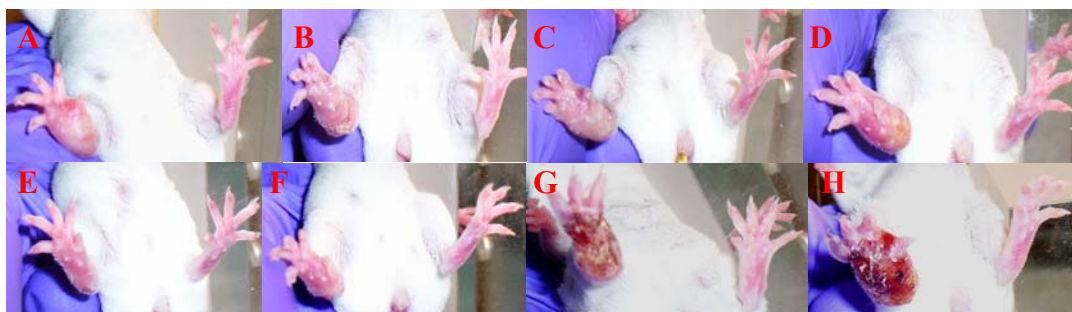


Figura 29. Lesiones en las almohadillas plantares después de 6 semanas p. i. Ratones inmunizados con los plásmidos pcDNA3 H2AH3 (A), pcDNA3 H2AH2B (B), pcDNA3 H2AH4 (C), pcDNA3 H2BH3 (D). Grupos inmunizados con los cócteles genéticos completos (E y F), con pcDNA3 vacío (G) o sólo con PBS (H).

En relación con lo anterior, los resultados de estimación parasitaria (Fig. 30) confirmaron que la administración de cualquiera de las construcciones genéticas que codificaban para dos histonas inducía en los ratones a la semana 7 p. i. una reducción de las cargas parasitarias en DLN poplíteo y en bazo, aunque sólo fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en este último órgano en relación a la cantidad de parásitos detectada en los controles. En cambio, en los ratones inmunizados con los cócteles completos con las cuatro histonas se observó una carga parasitaria en DLN poplíteo significativamente menor ($P < 0.05$) que en los controles y además no se detectó la visceralización de los parásitos. En un ensayo posterior hemos observado que animales inmunizados con los cócteles genéticos resistían una segunda infección (datos no mostrados).

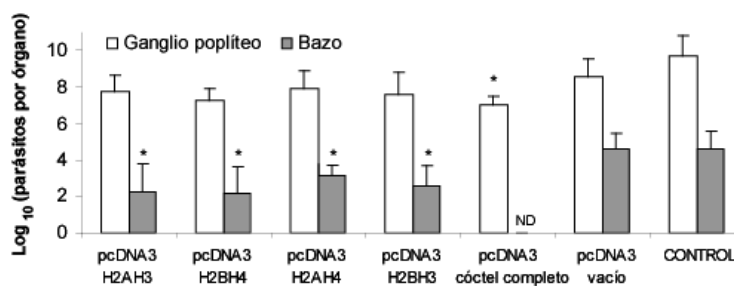


Figura 30. Estimación de las cargas parasitarias en ganglio poplíteo y en bazo a la semana 7 p. i. en los distintos grupos de ratones. ND: no se detectaron parásitos.

4.5.2. Inducción de dos tipos de perfiles inmunitarios de resistencia

El análisis porcentual de las poblaciones celulares por citometría y de la producción de citoquinas en DLN poplíteo de los ratones generó los siguientes resultados (Fig. 31). La administración de los cócteles genéticos completos promovió en todos los casos un aumento del porcentaje de células T productoras de IFN- γ así como un incremento de los niveles de IFN- γ parásito-específicos. Además, en estos ratones se observó un descenso del porcentaje de células T productoras de IL-4 acompañado por un descenso de los niveles de IL-4 parásito-específicos. En todos los casos estas variaciones fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en relación a los controles.

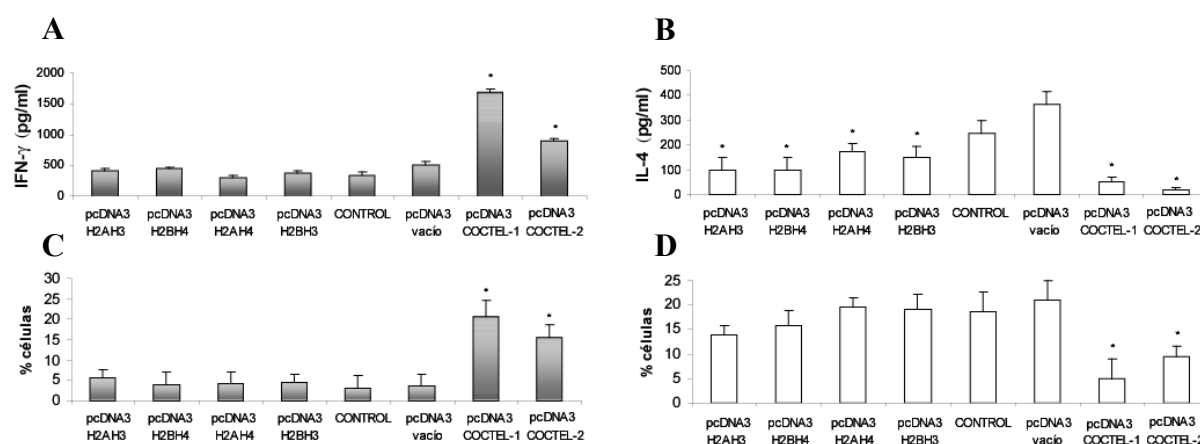


Figura 31. Estudio de la producción de citoquinas y de las poblaciones productoras de las mismas en ganglio poplíteo después de 7 semanas p. i. En todos los casos los cultivos celulares fueron estimulados en presencia de SLA durante 48 h. Niveles de IFN- γ (A) y de IL-4 (B). Porcentajes de linfocitos T productores de IFN- γ (C) o de IL-4 (D). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas (* $P < 0.05$) con respecto a los ratones control. Los resultados representan la media y desviación estándar de cada grupo de ratones ($n = 8$).

En cambio, la administración de las construcciones genéticas que sólo codificaban para dos histonas no indujo variaciones significativas en cuanto a los porcentajes de las poblaciones celulares analizadas en DLN ni en cuanto a la producción de IFN- γ . Sin embargo, en estos ratones se detectó un descenso significativo ($P < 0.05$) en la producción de IL-4 parásito-específica en comparación con los ratones control. La administración de los cócteles completos no sólo promovió una respuesta antileishmanial de tipo Th1 mientras restringía la de tipo Th2, sino que además los ratones inmunizados con esta formulación presentaron un cociente CD80/CD86 mayor ($P < 0.05$) que en los ratones control. Además, se detectó una menor ($P < 0.05$) acumulación de células Treg en relación a los controles en el ganglio poplíteo. La administración de las construcciones genéticas que contenían dos histonas también promovió un cociente CD80/CD86 mayor que en los ratones control ($P < 0.05$). Sin embargo, se observó la misma acumulación de células Treg en el sitio de infección que en los ratones control (Fig. 32).

El estudio de la respuesta humoral mediante ELISA en los distintos grupos de ratones mostró que sólo los vacunados con el cóctel completo desarrollaron títulos muy bajos de anticuerpos en relación a los controles ($P < 0.05$). Las construcciones genéticas dobles indujeron títulos similares de IgG1 anti-SLA que los controles. En general, la administración genética de histonas promovió una síntesis mixta de anticuerpos anti-HIS, aunque fue en los ratones inmunizados con las construcciones genéticas dobles donde se observaron los mayores títulos de IgG1 anti-HIS (Fig. 33).

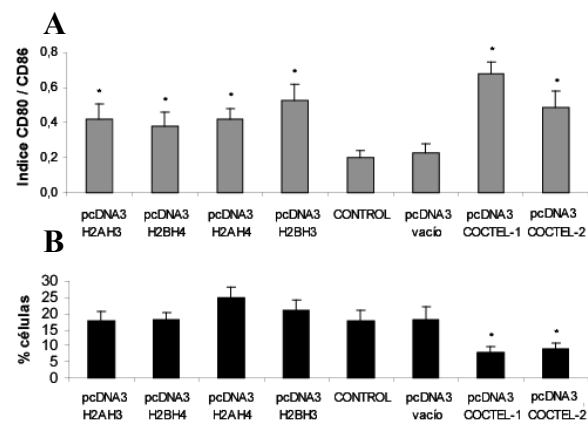


Figura 32. Estimación del cociente CD80/CD86 después de analizar por citometría de flujo la expresión de dichas moléculas coestimuladoras en la superficie de células CD11c⁺ (A). Porcentaje de células Treg Foxp3⁺IL10⁺ (B). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas (* $P < 0.05$) con respecto a los ratones control. Se representa el promedio y desviación estándar de cada grupo de ratones (n = 8).

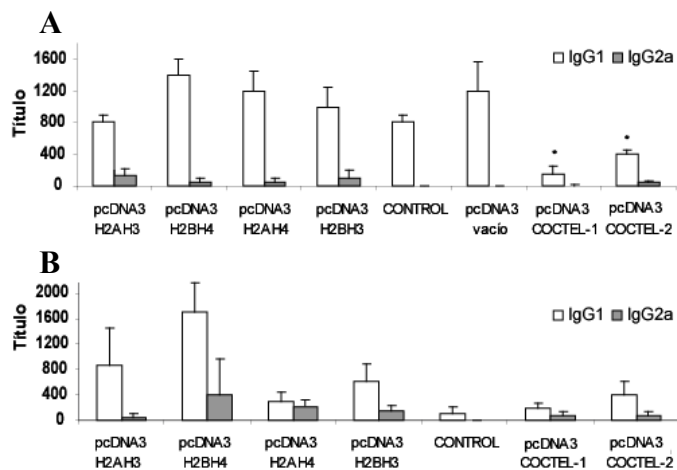


Figura 33. Titulación de las respuestas humorales frente a SLA (A) y frente a HIS (B). Los sueros se obtuvieron a las 7 semanas p. i. y se determinaron los anticuerpos de los isotipos IgG1 e IgG2a. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los ratones inmunizados y los controles (* $P < 0.05$). Se representa el promedio y desviación estándar de cada grupo (n = 8).

4.6. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LV

Siguiendo la misma metodología descrita anteriormente se inmunizaron los distintos grupos de ratones con las construcciones genéticas que codificaban para dos histonas. En este ensayo no se incluyó un grupo inmunizado con un cóctel genético que codificara para las cuatro histonas porque en un estudio anterior habíamos observado que esta formulación no inducía protección frente a LV (datos no mostrados). Un mes después de la última administración genética los ratones se infectaron con *L. infantum* para estudiar el efecto de las inmunizaciones con las histonas dobles frente a LV.

4.6.1. Determinación de las cargas parasitarias

Después de 4 semanas desde la infección visceral los ratones se sacrificaron y se estimaron las cargas parasitarias en bazo y en hígado. Los estudios de dilución límite mostraron que los ratones inmunizados con los diferentes plásmidos que codificaban para dos histonas tenían cargas parasitarias en bazo e hígado similares a las de los ratones control (Fig. 34).

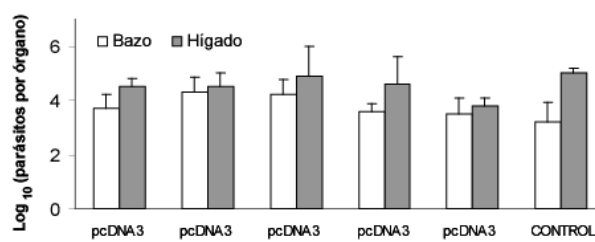


Figura 34. Estimación de las cargas parasitarias en bazo y en hígado después de 1 mes p. i. Los resultados representan la media y desviación estándar de cada grupo de ratones (n = 8).

4.6.2. Incapacidad para suscitar una respuesta inmunitaria capaz de controlar la infección visceral

La administración de las construcciones genéticas que codificaban para dos histonas no indujo variaciones significativas en cuanto a los porcentajes de las poblaciones celulares analizadas en bazo ni en cuanto a la producción de las citoquinas IFN- γ e IL-10 en relación a los ratones control (Fig. 35).

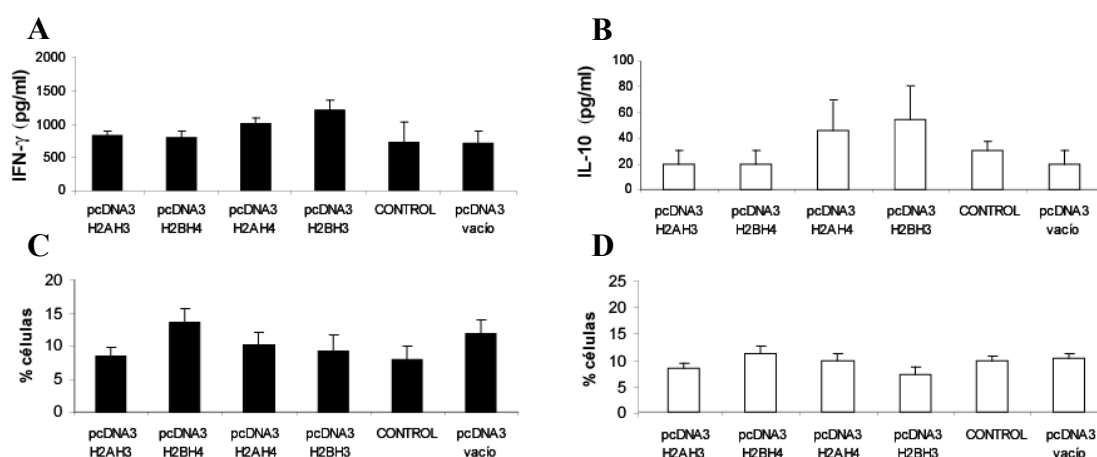


Figura 35. Estudio de la producción esplénica de citoquinas y de las poblaciones productoras de las mismas después de 1 mes p. i. En todos los casos los cultivos celulares fueron estimulados en presencia de SLA durante 48 h. Niveles de IFN- γ (A) y de IL-10 (B). Porcentajes de linfocitos T productores de IFN- γ (C) o de IL-10 (D). Los resultados representan la media y desviación estándar de cada grupo de ratones (n = 8).

Los grupos pcDNA3H2AH4 y pcDNA3H2BH3 producían unos niveles ligeramente superiores de IFN- γ , pero también de IL-10 en relación a los controles. Como consecuencia los índices IFN- γ /IL-10 de los grupos inmunizados no diferían de los controles.

Finalmente, en todos los ratones inmunizados se detectaron unos índices CD80/CD86 así como una acumulación de células Treg en bazo similares a los correspondientes en los ratones control (Fig. 36). Esto puso de manifiesto que las construcciones genéticas dobles suscitaron una respuesta inmunitaria incapaz de controlar la infección visceral.

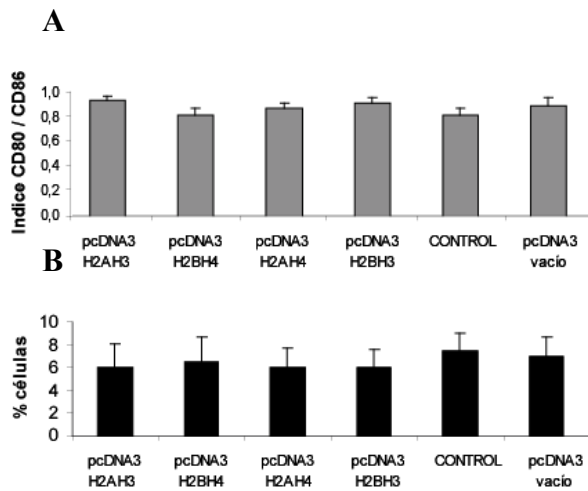


Figura 36. Estimación del cociente CD80/CD86 sobre las células CD11c⁺ de bazo (A). Porcentaje de células esplénicas Treg Foxp3⁺IL10⁺ (B). Se representa el valor medio y desviación estándar de cada grupo de ratones (n = 8).

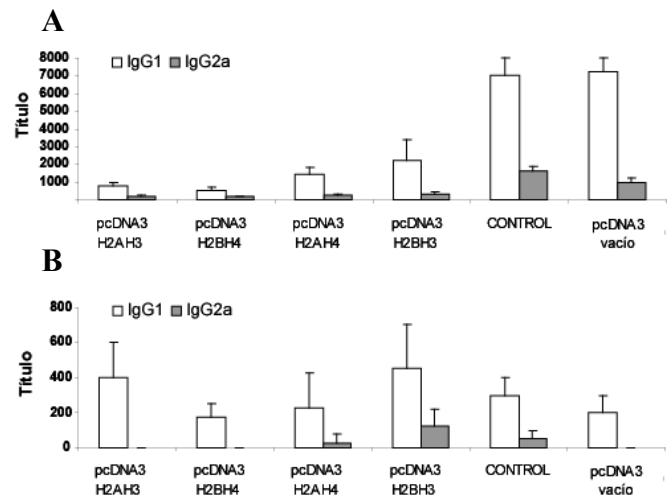


Figura 37. Titulación de las respuestas humores frente a SLA (A) y frente a HIS (B). Se analizaron mediante ELISA los títulos de anticuerpos de los isotipos IgG1 e IgG2a después de 4 semanas p. i. Se representa el valor medio y desviación estándar de cada grupo de ratones (n = 8).

En lo referente a la producción de anticuerpos anti-SLA, en todos los ratones inmunizados con las construcciones genéticas dobles se detectaron títulos de anticuerpos anti-SLA más bajos que los controles, aunque las relaciones IgG2a/IgG1 no fueron estadísticamente diferentes entre los distintos grupos. La producción de anticuerpos anti-HIS fue similar a la observada en los ratones control (Fig. 37).

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

5.1. Modelo experimental BALB/c de LV. Estudio de las características inmunohistológicas inducidas por la infección con *L. infantum*

Es esencial tener en cuenta que la progresión de la infección experimental con la especie *L. infantum* está determinada por el establecimiento de un fino balance inmunitario que finalmente promueve una resistencia hepática y una persistencia parasitaria esplénica en el hospedador (Stanley & Engwerda, 2006).

Uno de los objetivos propuestos era conseguir un modelo experimental adecuado para valorar la generación de resistencia inmunitaria en ratón frente a LV. Para ello hemos analizado las características inmunohistológicas inducidas por la infección intravenosa de ratones BALB/c con 10^3 , 10^5 o 10^6 promastigotes de *L. infantum*. En todos los casos tuvo lugar el establecimiento de la infección visceral cuyo desarrollo posterior resultó ser dependiente del tamaño de inóculo infectivo. A diferencia de lo que sucedía en estudios con hámster (Melby & col., 2001a), los resultados que hemos obtenido no mostraron diferencias en cuanto a la celularidad de la médula ósea ni al valor hematocrito de los ratones infectados, posiblemente porque el ratón no es un modelo tan susceptible como el hámster. En cambio, de acuerdo con otros estudios (Cotterell & col., 2000) se detectó un incremento en el número de megacariocitos en el bazo de los ratones infectados con 10^6 parásitos. Esto podría ser debido a la puesta en marcha de un mecanismo hematopoyético extra-medular para compensar la pérdida de funcionalidad que conlleva la expansión parasitaria. Además, los ratones infectados con 10^6 parásitos muestran una inmunodepresión de su respuesta celular esplénica frente a agentes mitogénicos que concuerda con otros estudios (Lehmann & col., 2000; Melby & col., 1998; Mukherjee & col., 2003).

Los altos niveles de nitritos y de actividad arginasa en bazo también fueron proporcionales al tamaño del inóculo infectivo. La alta carga parasitaria esplénica que se detectó en los ratones infectados con 10^6 parásitos podría explicar un inesperado aumento de la síntesis de los niveles de nitritos en fases tardías de infección. Sin embargo, la función de la respuesta leishmanicida dependiente de NO pudo haber sido atenuada por varios factores, entre los que destacaron, en primer lugar, la elevada actividad arginasa detectada en estos ratones, que ya ha demostrado guardar una clara asociación con la supervivencia de *Leishmania* (Inieta & col., 2001; Inieta & col., 2002; Kropf & col., 2004) y en segundo lugar, el efecto de la IL-10 (Bhattacharyya & col., 2001; Murphy & col., 2001; Shibata & col., 1998). De hecho, únicamente en los bazos de los ratones infectados con 10^6 parásitos se mantuvieron altos los niveles de IL-10 a los 56 días p. i. Esto pudo atenuar la respuesta proinflamatoria del hospedador haciendo que la síntesis de IFN- γ y como consecuencia de NO, que se detectó de forma indirecta en forma de nitritos, no tuvieran un efecto letal para los parásitos. Por tanto, a diferencia de lo que sucedió con inóculos parasitarios más bajos, la infección con 10^6 parásitos hizo imposible que los ratones pudieran llegar a controlar la infección.

Los resultados mostraron la persistencia de los parásitos en bazo, mientras que en hígado fueron eliminados a los 56 días p. i. en los ratones que habían sido infectados con 10^3 y 10^5 parásitos. Así, la capacidad leishmanicida de la respuesta inmunitaria parecía ser específica del órgano considerado (Engwerda & Kaye, 2000). La persistencia parasitaria en el hígado de los ratones infectados con 10^6 parásitos reveló que la capacidad de la respuesta inmunitaria del hospedador de eliminar los parásitos era también dependiente del inóculo

infectivo inicial, consiguiéndose un control de la infección con inóculos de 10^3 y 10^5 parásitos, pero no con 10^6 parásitos (Ahmed & col., 2003). Los datos sugirieron que la presencia de parásitos en médula ósea constituye un buen indicador del grado de infección y su ausencia podría emplearse como indicador de protección en ensayos de vacunación en los que los ratones sean infectados con 10^6 parásitos. La elevada respuesta humoral anti-SLA obtenida en los ratones infectados con el inóculo parasitario más alto concuerda con otros estudios (Abranches & col., 1991; Evans & col., 1990; Rhalem & col., 1999; Rica-Capela & col., 2003) y nos permite concluir que los anticuerpos anti-*Leishmania* no son necesarios para desarrollar una respuesta protectora. El aumento de granulocitos en el bazo de los ratones infectados con 10^3 parásitos pudo ser reflejo de la regulación del crecimiento parasitario que se ha descrito para estas células con capacidad de lisar tanto células infectadas como parásitos extracelulares antes de entrar en la célula hospedadora (Rousseau & col., 2001; Smelt & col., 2000). Sin embargo, esta función reguladora parece estar ausente en ratones infectados con inóculos infectivos más altos. Probablemente, el incremento de células presentadoras $CD11c^+$ y $CD11c^+CD40^+$ en el bazo de los ratones infectados con 10^6 parásitos podría estar relacionado con el posterior aumento de la respuesta humoral parásito-específica como consecuencia de una mayor presentación antigénica en fase de infección temprana.

Nuestros datos no mostraron ninguna variación en la cantidad de linfocitos $TCD4^+$ y $TCD8^+$. Es probable que este hecho esté relacionado con la estrategia que ha desarrollado el parásito mediante la síntesis de IL-10 para dificultar la migración de las CD impidiendo la estimulación de los linfocitos T (Basu & col., 2000; Engwerda & col., 2004). Todo apunta a que el balance $IFN-\gamma/IL-10$ dirige la entrada en la fase de control de la infección. Los datos de producción de citoquinas mostraron que la síntesis de IL-10 favoreció un fenotipo susceptible en los ratones infectados con 10^6 parásitos mediante la atenuación de la respuesta inflamatoria. De hecho, estos ratones mostraron un desequilibrio en la producción de $IFN-\gamma/IL-10$. Es posible que este desequilibrio fuera responsable del incremento de la carga parasitaria. En cambio, en los ratones que habían sido infectados con 10^5 parásitos la producción de IL-10 guardó un equilibrio con respecto a la producción de $IFN-\gamma$ desde el día 28 al 56 p. i. que podría relacionarse con el mantenimiento de una homeostasis inmunitaria, como ya se ha sugerido en otros trabajos (Bacellar & col., 2000; Gomes-Pereira & col., 2004a), y como consecuencia con el control de la infección.

Hay estudios que relacionan la síntesis temprana de IL-4 con la formación de granulomas hepáticos con actividad leishmanicida (Stager & col., 2003). Sin embargo, nuestros datos indican claramente que la síntesis de IL-4 en bazo es independiente de la progresión de la infección con *L. infantum*. Por tanto, los factores que determinan el establecimiento definitivo o la eliminación de la infección en lo que a citoquinas se refiere parece ser el momento en el que estas se producen, así como el balance que mantienen con otras citoquinas (Rhodes & Graham, 2002).

Los datos histológicos mostraron que tanto la pérdida de folículos linfoides en la pulpa blanca del bazo, como la adquisición del control de la infección en hígado fueron dependientes del tamaño del inóculo infectivo. Hay estudios que describen la formación de granulomas hepáticos tanto en hospedadores susceptibles como resistentes a la infección por *Leishmania* (Kaye, 2000; Wilson & Weinstock, 1996). La formación de granulomas no siempre está asociada al control de la infección con especies viscerales de *Leishmania* (Engwerda & Kaye, 2000; Murray, 2000). Otros estudios demuestran que una óptima maduración granulomatosa depende de la síntesis de citoquinas proinflamatorias de la familia TNF (Kaye & col., 2004; Murray & col., 1992), mientras que otros estudios implican a estas

citoquinas en la destrucción de macrófagos de la zona marginal y en la patología esplénica en general (Stanley & Engwerda, 2006). Nuestros datos sugieren que la maduración granulomatosa es dependiente del tamaño de inóculo infeccioso inicial. Así, la eliminación parasitaria en hígado en los ratones infectados con 10^5 parásitos fue consecuencia del establecimiento de una respuesta granulomatosa temprana que maduró progresivamente hacia los 56 días p. i. En cambio, en los ratones infectados con 10^6 parásitos hubo un retraso en el establecimiento de la respuesta granulomatosa y además los granulomas mostraron dificultad en su maduración lo que favoreció la persistencia parasitaria.

El nivel de protección que proporcionan las vacunas desarrolladas contra LC murina es mayor que las diseñadas frente a LV (Requena & col., 2004). Este hecho puede indicar que no existe un modelo animal apropiado para el estudio de ensayos de vacunación (Ahmed & col., 2003) o que simplemente las formulaciones estudiadas hasta el momento frente a LV confieren un bajo nivel de protección. Además, la relevancia del inóculo infeccioso administrado pone de manifiesto la enorme complejidad del fenómeno (Engwerda & col., 2004) y demuestra la necesidad de desarrollar modelos apropiados de infección.

En resumen, nuestros datos indican que un incremento en granulocitos en los ratones infectados con 10^3 parásitos podría servir como marcador asociado a protección, aunque no es suficiente para probar la eficacia de vacunas contra LV. En cambio, el aumento de megacariocitos en bazo acompañado de una disminución de la respuesta esplénica mitogénica en los ratones infectados con 10^6 parásitos constituye un marcador específico de infección severa a tener en cuenta en futuros estudios que empleen este inóculo parasitario. Sin embargo, el modelo de infección de alto inóculo infeccioso podría subestimar la eficiencia potencial del candidato vacunal ensayado debido al efecto inhibitorio que ejerce este inóculo parasitario sobre la respuesta inmunitaria en hígado. Finalmente, estos datos indican que la infección en ratones BALB/c con 10^5 parásitos constituye el modelo más adecuado para el estudio de varios marcadores del grado de infección: nivel de anticuerpos anti-SLA, aumento de la actividad arginasa esplénica, balance IFN- γ /IL10 en bazo, depleción linfocítica en la pulpa blanca del bazo y cantidad relativa de granulomas hepáticos inmaduros. Por último, la ausencia de parásitos en la médula ósea y la cantidad relativa de granulomas maduros y estériles pueden ser marcadores asociados a protección de gran utilidad en futuros estudios de vacunación contra LV.

5.2. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LC

El presente estudio de vacunación sugiere que una sola administración de CD-HISCpG confiere en ratones BALB/c un control de la infección por *L. major*, desde los puntos de vista parasitológico e histopatológico. Estos ratones presentaron una reducción de sus cargas parasitarias en el sitio primario de infección (oreja) acompañado por una ausencia de visceralización parasitaria y generaron una resistencia inmunitaria frente a la reinfección. La administración de CD-HIS promovió, en comparación con los ratones control, una disminución de la lesión dérmica en la oreja y un retraso en la aparición de la misma. Sin embargo, estos ratones no fueron capaces de controlar una segunda infección. De acuerdo a lo que ya se había descrito, la administración de CD-CpG no promueve un control de la infección por *L. major* (Shah & col., 2003). Los datos indican que la resistencia a LC está asociada con la restricción de la respuesta Th2 *Leishmania*-específica. De hecho, los niveles más bajos de citoquinas Th2, así como una reducción del porcentaje de linfocitos T productores de IL-4 fueron detectados en los ganglios maxilares de los ratones que controlaron la infección primaria. Los niveles absolutos de IFN- γ observados en estos ratones

no fueron estadísticamente diferentes de los observados en los ratones incapaces de controlar la infección, sin embargo existen otros parámetros indicativos de la adquisición de resistencia a la infección. Entre estos hay que considerar los balances CD80/CD86. En ratones BALB/c infectados con *L. donovani* el bloqueo de CD86 con un anticuerpo específico ya ha demostrado ser un tratamiento efectivo para reducir la carga parasitaria en hígado debido a una estimulación preferente de tipo Th1 (Murphy & col., 1997). Otros parámetros a tener en cuenta son los índices IFN- γ /IL-10 e IgG2a/IgG1. En conjunto, los cocientes más altos para estos parámetros los presentaron los animales vacunados con CD-LmCpG o -HISCpG.

De acuerdo con recientes estudios que relacionan la persistencia parasitaria con las células Treg productoras de IL-10 (Belkaid & col., 2002a; Stober & col., 2005; Suffia & col., 2006), nuestros datos indican que la eficacia de la respuesta inmunitaria en los ratones vacunados con CD-Lm o -HISCpG podría ser dependiente de una reducción del porcentaje de células Treg Foxp3⁺ y del establecimiento de una baja persistencia parasitaria en el sitio de infección. En conjunto, estos requisitos favorecen el establecimiento de una respuesta inmunitaria capaz de controlar la reinfección por *L. major*. De hecho ya se ha sugerido que el mantenimiento de una carga parasitaria basal y de células Treg productoras de IL-10 en el sitio de infección es necesario para preservar una respuesta adquirida frente a segundas infecciones. Por tanto, aquellos ratones en los que el control de la infección va acompañado de una eliminación parasitaria completa, pierden la capacidad de resistir una segunda infección por *L. major* (Belkaid & col., 2002a). Además, otros estudios demuestran que sólo en condiciones de persistencia parasitaria, puede establecerse un equilibrio entre linfocitos T efectores y células Treg que finalmente determina la eficacia de la respuesta inmunitaria (Mendez & col., 2004). Por tanto, sugerimos la importancia que tiene la reducción de la carga parasitaria en el sitio de infección acompañada por la existencia de una recirculación de células de memoria que confieran resistencia frente a posibles reinfecciones.

Estudios consolidados asocian los incrementos de la actividad arginasa en ratones infectados con la generación de poliaminas implicadas en la supervivencia de *Leishmania* y su diseminación en el hospedador (Iniesta & col., 2005; Iniesta & col., 2001; Iniesta & col., 2002). En concordancia con dichos estudios, nuestros resultados mostraron que los niveles más bajos de actividad arginasa esplénica se detectaron en los ratones vacunados con CD-LmCpG o -HISCpG comparados con los obtenidos en ratones controles que sufrieron visceralización parasitaria. Estos datos indican que los altos niveles de citoquinas Th2 y la actividad arginasa están asociados en ratones que no controlan la infección. Así, como ya se ha sugerido anteriormente, nuestros resultados confirman que una alta actividad arginasa I puede constituir un buen marcador de la progresión de la enfermedad y de la diseminación parasitaria en leishmaniosis (Iniesta & col., 2005).

La evaluación histológica de los sitios de infección secundaria determinó que sólo los ratones vacunados con CD-HISCpG fueron capaces de alcanzar un control completo de la reinfección. En las almohadillas plantares de estos ratones se observaron pequeñas lesiones acompañadas, sólo en algunos casos, de una ligera patología. En todos los casos la arquitectura epidérmica de la almohadilla plantar fue normal sin signos de ulceración. Los ratones vacunados con CD-LmCpG también fueron capaces de controlar la segunda infección, aunque presentaron infiltrados inflamatorios variables con macrófagos infectados en la almohadilla plantar. En cambio, los ratones vacunados con CD-HIS que habían resistido a la primera infección, no controlaron la segunda infección presentando lesiones similares a los controles. Esto demuestra que es necesario acompañar determinados Ag de *Leishmania* con

algún adyuvante (motivos CpG) para dirigir de forma eficiente la respuesta inmunitaria innata-adquirida y poder conferir memoria a largo plazo en el hospedador (Pulendran, 2004).

Aunque ya se ha descrito como la formulación LmCpG está implicada en la resistencia frente a la infección por *L. major* (Ramirez-Pineda & col., 2004; Rhee & col., 2002), hay que señalar que la inoculación con el parásito completo no representa una alternativa viable (Colino & Snapper, 2003). Esto es debido a dificultades a la hora de estandarizar el método, así como a problemas éticos y de seguridad en lo referente a que la virulencia parasitaria pueda revertir. Por tanto, parece que una vacuna basada en la administración de CD-HISCpG puede constituir un método alternativo adecuado para generar una respuesta inmunitaria antileishmanial en ratones susceptibles BALB/c.

5.3. Estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas frente a LV

A diferencia de la adquisición de una respuesta inmunitaria efectiva frente a LC con ausencia de visceralización parasitaria, en los ratones vacunados con CD-HIS o -HISCpG, este tipo de vacunación no suscitó la capacidad de controlar la infección visceral por la especie *L. infantum*. Sin embargo, se observó una ligera reducción de la carga parasitaria en el 50 % de los animales vacunados con CD-HIS o -HISCpG tanto en bazo como en hígado en relación a los ratones control. Esta disminución de la carga parasitaria parecía estar relacionada con una bajada del porcentaje de células Treg en bazo. Aunque se ha descrito el papel de estas células en los sitios de infección por *L. major* (Belkaid & col., 2002a; Mendez & col., 2004; Stober & col., 2005; Suffia & col., 2006), no parecen existir datos relativos a su papel frente a LV (Peters & Sacks, 2006). En los ratones vacunados con CD-HIS o -HISCpG también se observó un aumento en los índices células Tefectoras/células Treg e IgG2a/IgG1 en relación a los ratones control. En conjunto, estos datos sugieren que la administración de CD-HIS o -HISCpG promovió en los ratones una ligera atenuación del perfil de susceptibilidad de la respuesta inmunitaria humoral parásito-específica, probablemente regulado por una baja acumulación de células Treg a nivel esplénico.

5.4. Construcciones genéticas de las histonas

El análisis que confirmaba la expresión de las construcciones genéticas en células COS7 de mamífero hizo posible que se llevaran a cabo los correspondientes ensayos de inmunización en ratón con cada uno de los cuatro clones recombinantes pcDNA3H2AH3JC, pcDNA3H2BH4JC, pcDNA3H2AH4JC y pcDNA3H2BH3JC. Es importante tener en cuenta que en estudios anteriores se empleaba una vía de inoculación intramuscular (Iborra & col., 2004) que requería de una administración de 200 µg de plásmido recombinante por animal. En cambio, en estos experimentos sólo con 80 µg de ADN plasmídico se consiguió inducir la respuesta inmunitaria. Probablemente, esto sea debido a que en la vía de inmunización intramuscular el ADN es transferido a miocitos que son dependientes de células presentadoras profesionales adyacentes a las que transferir el Ag, con lo que la inducción de la respuesta inmunitaria es menos eficaz (Babiuk & col., 2000a; Babiuk & col., 1999; Gregersen, 2001). En la piel hay una alta densidad de CD lo que favorece que a través de una inmunización subcutánea el ADN plasmídico sea transferido directamente a las CD dotadas de todas las moléculas accesorias necesarias para iniciar una respuesta inmunitaria. Esto constituye un modo de optimización de la inmunización genética que concuerda con otros estudios experimentales (Mendez & col., 2002). Otros trabajos han confirmado que la inmunización genética con histonas induce una fuerte respuesta de tipo Th1 protectora en ratón frente a la infección por *Leishmania* (Melby & col., 2000). Un mes después de inocular a los ratones por

última vez, se estudió el efecto inmunitario de estas administraciones genéticas frente a LC y frente a LV.

5.4.1. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LC

El establecimiento de una respuesta inmunitaria capaz de controlar la infección por la especie *L. major* en los ratones inmunizados con cualquiera de los cócteles genéticos (cóctel-1 ó cóctel-2) que codificaban para las cuatro histonas concuerda con datos publicados anteriormente (Iborra & col., 2004). Además, este hecho constituye una prueba *in vivo* de que las cuatro construcciones obtenidas pcDNA3H2AH3JC, pcDNA3H2BH4JC, pcDNA3H2AH4JC y pcDNA3H2BH3JC se expresaron en células de mamífero.

La administración de los cócteles completos promovió un aumento del cociente CD80/CD86 en las células CD11⁺ de los DLN del sitio de infección. Es probable, que esto estuviera implicado en la estimulación de una respuesta de tipo Th1 (Antoine & col., 2004) con efectos antileishmaniales mediados principalmente por la producción de IFN- γ . Además, esta formulación indujo una restricción del perfil de tipo Th2 a través de la reducción de la síntesis tanto de IL-4 como de anticuerpos anti-SLA, acompañada por una baja acumulación de células Treg en relación a los controles. De acuerdo con estudios en LC (Peters & Sacks, 2006) esto estaría implicado en el mantenimiento de un fino equilibrio entre linfocitos efectores y reguladores, responsable último del mantenimiento de una homeostasis inmunitaria así como de una memoria inmunológica frente a segundas infecciones.

Aunque la administración en ratón de las construcciones genéticas que contenían dos histonas también indujo un aumento del cociente CD80/CD86, esto fue insuficiente para mantener una respuesta Th1 ya que en los DLN poplíteos de estos ratones se acumularon células Treg en cantidades similares a los controles. Estos datos sugirieron que la respuesta antileishmanial pudo resultar atenuada. Sin embargo, estos ratones conservaron una ligera capacidad de restringir la síntesis de IL-4 en relación a los grupos control. Este ambiente de citoquinas y la relación entre células efectoras y reguladoras podría explicar el establecimiento en estos ratones de una respuesta inmunitaria capaz de retrasar los signos de enfermedad sólo durante las seis primeras semanas de infección con *L. major*.

5.4.2. Inmunización en ratón BALB/c con las construcciones genéticas de las histonas frente a LV

A diferencia de la inducción en ratón de una protección parcial acompañada por un retraso en el desarrollo de la lesión y de una disminución de la visceralización por *L. major*, el mismo esquema de inmunización con las construcciones genéticas que codificaban para dos histonas suscitaron una respuesta inmunitaria incapaz de controlar la infección visceral por la especie *L. infantum*.

En los ratones inmunizados se detectaron unos patrones de síntesis de citoquinas y de células productoras de las mismas que no diferían de los generados en los ratones control. La acumulación de células Treg y la respuesta humoral también fue similar entre los distintos grupos de ratones. Este ambiente de citoquinas y de la relación entre éstas y las funciones linfocitarias efectoras y reguladoras favoreció la adquisición de un perfil inmunitario susceptible frente a LV.

5.5. Ventajas de la inmunización genética multicomponente. Progresión de la leishmaniosis

En conjunto, estos datos sugieren que la administración genética de las cuatro histonas favorece la adquisición de una resistencia inmunitaria frente a la infección por *L. major* más eficiente que la inmunización con sólo dos histonas. En el primer caso, la inmunización multicomponente con las cuatro histonas nucleosomales promueve una respuesta inmunitaria parásito-específica de tipo Th1 y la restricción de la de tipo Th2. Todo esto parece estar regulado por un descenso de la acumulación de células Treg en los ganglios drenantes al sitio de infección primario. En el segundo caso, la administración genética con dos histonas también es capaz de restringir una respuesta inmunitaria parásito-específica de tipo Th2, pero la respuesta de tipo Th1 queda atenuada como consecuencia de una alta acumulación de células Treg en el sitio de infección. Esto explica que en los ratones inmunizados con las construcciones genéticas que contienen dos histonas se induce un control transitorio de la infección a nivel de inflamación y carga parasitaria. En cambio, en los ratones inmunizados con las cuatro histonas se promueve un control total de la infección e incluso una memoria inmunológica de resistencia frente a una segunda infección por *L. major*.

Por otro lado, los resultados indican que estas mismas administraciones genéticas, que contienen dos o las cuatro histonas, fueron incapaces de suscitar ninguna clase de resistencia en ratón frente a la infección por *L. infantum*. Esto está de acuerdo con multitud de estudios que describen en el hospedador una naturaleza inmunitaria completamente distinta según la especie de *Leishmania* implicada, principalmente entre especies causantes de LC y de LV (Engwerda & Kaye, 2000; Sacks & Noben-Trauth, 2002). Nuestros ensayos de inmunización genética con las histonas se alejan de los resultados de restricción del crecimiento parasitario que observan otros autores en ganglios de perros inmunizados con una construcción de ADN multicomponente que incorpora las cuatro histonas nucleosomales entre otros Ag leishmaniales (Saldarriaga & col., 2006). Es probable que el propio carácter multicomponente, con un total de diez Ag, de la vacuna mencionada frente a LV canina sea la razón de que se observe una ligera reducción transitoria de la carga parasitaria en ganglio.

En contra de lo que cabría esperar según nuestros resultados de inmunización genética frente a LV, la administración de las CD cargadas con histonas promueve una ligera reducción de las cargas parasitarias en bazo y en hígado en el 50 % de los animales infectados con *L. infantum*. Esto pone de manifiesto la utilidad de la estrategia de vacunación con CD a la hora de mejorar la eficacia de una respuesta antileishmanial.

5.6. Esterilidad versus persistencia parasitaria. Curación o memoria inmunitaria

En general, las vacunas genéticas frente a leishmaniosis pueden actuar bien previniendo la enfermedad, bien induciendo una esterilidad parasitaria. En el primer caso se podría evitar el desarrollo de una fase severa de la enfermedad y por tanto su desenlace letal. Nuestros resultados indican que la persistencia parasitaria en ratón acompañada de una circulación de células reguladoras y células de memoria son requisitos imprescindibles para lograr el control de una segunda infección por *Leishmania*. Sin embargo, considerando un posible salto de especie, en la naturaleza los perros protegidos funcionarían como posibles reservorios para transmitir la enfermedad, incluso al hombre (Alvar & col., 1994; Vexenat & col., 1994). Así, una vacuna genética inductora de una esterilidad parasitaria parece a priori una alternativa más adecuada para luchar contra la leishmaniosis canina ya que se eliminan los amastigotes residentes en la piel aparentemente sana del animal. Este tipo de vacunas

esterilizadoras podría prevenir el desarrollo de la leishmaniosis sin suponer un riesgo de transmisión en la naturaleza (Hommel & col., 1995). Sin embargo, estas vacunas eliminan la capacidad del hospedador de generar una memoria inmunológica a largo plazo frente a segundas infecciones por *Leishmania*.

Los objetivos de este trabajo no se orientaron hacia la consecución de una vacuna frente a leishmaniosis, sino hacia la investigación del efecto que diversas estrategias de inmunización pudieran tener en el modelo murino frente a LC y LV. La gran dificultad que conlleva el diseño y la elección de un candidato vacunal frente a la leishmaniosis reabre el ya viejo debate sobre las propiedades deseadas que dicha vacuna debe tener desde distintos puntos de vista.

5.7. Ventajas e inconvenientes de la inmunización genética y de la vacunación con CD en el contexto de las histonas. Perspectivas de futuro

La inmunización con los plásmidos de ADN que codifican para las histonas da como resultado la expresión de estos patoantígenos en su forma nativa. Esto favorece que el procesamiento y la presentación antigénica al sistema inmunitario sean muy eficientes. Los plásmidos empleados son estables y su obtención es fácil y reproducible. Además, se inducen respuestas humorales y celulares específicas. En general, ventajas como estas hacen que las vacunas genéticas hayan cobrado un gran interés para combatir enfermedades de ámbito veterinario y humano frente a las vacunas convencionales (Cohen & col., 1998; Ramsay & col., 1997; Taubes, 1997). No hay que descartar otras estrategias alternativas como el empleo de CD. La vacunación con CD en humanos no está exenta de inconvenientes. Además de los problemas de incompatibilidad entre individuos, la reproducción metodológica es laboriosa y costosa. Esto implica que la vacunación con CD no constituya por sí misma una alternativa profiláctica de primera línea de elección (Colino & Snapper, 2003). Sin duda todos los ensayos experimentales con CD contribuyen a ampliar el conocimiento que tenemos sobre el funcionamiento del sistema inmunitario. Este es el caso de la administración de CD cargadas con histonas que han mostrado promover en ratón respuestas inmunitarias de resistencia frente a la infección con *L. major* y una reducción de la carga parasitaria frente a la infección con *L. infantum* en el 50% de los casos. En cambio, la administración genética de las histonas favoreció el control total o parcial de la infección cutánea, pero no el de la infección visceral. Esto pone de manifiesto el papel esencial que desempeñan las CD a la hora de atenuar el perfil de susceptibilidad de la respuesta inmunitaria inducida. Además, la estrategia vacunal con CD sólo requiere de una sola administración intravenosa en el animal, mientras que en la administración genética se realizan hasta tres inmunizaciones.

La inmunización genética con las cuatro histonas inducía resistencia frente a una segunda infección por *L. major*. Sin embargo, de acuerdo con el uso de adyuvantes en otros estudios (Pulendran, 2004), cuando se siguió una estrategia vacunal con CD sólo la coadministración de histonas con motivos CpG confirió resistencia frente a la reinfección cutánea. Es probable que la diferencia entre ambas estrategias sea debida al efecto adyuvante intrínseco de los plásmidos de ADN para orientar la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo Th1 de resistencia. De hecho, estudios recientes describen que la coadministración genética con adyuvantes como la IL-12 no aumenta la intensidad de la respuesta protectora que genera el mismo ADN plasmídico en ausencia de adyuvante (Saldarriaga & col., 2006).

Considerando en conjunto estos resultados se abren posibles líneas de actuación desde una perspectiva terapéutica y de vacunación. Sin perder de vista los inconvenientes del

empleo de CD y siendo conscientes de que el objetivo perseguido es distribuir y presentar de forma eficiente las histonas dentro del sistema inmunitario, sería factible el diseño de una estrategia dirigida hacia las CD endógenas del propio hospedador. Son múltiples las opciones que se presentan para ello. Por ejemplo, una posible alternativa sería la coadministración de las histonas y alguna molécula diana para los receptores de superficie de las CD. Podrían emplearse ligandos de CD-40 ó PAMP como los motivos CpG que interaccionan con los TLR-7 y -9 de las CD plasmacitoides humanas, o con todos los TLR, excepto los anteriores, en el caso de que la interacción sea con CD mieloides, favoreciendo respectivamente la síntesis de IFN- γ ó IL-12 (Jarrossay & col., 2001). También parece prometedor el uso de HSP en vacunas peptídicas contra patógenos intracelulares (Colino & Snapper, 2003). Así, posiblemente la coadministración de las histonas con algunas de las HSP del propio hospedador resultaría en la activación de las CD a través de los TLR-2 y -4 y en la presentación final de los péptidos de las histonas a través de moléculas MHC-I. Además las HSP funcionarían como Ag propios sin inducir una respuesta inmunitaria frente a ellos.

En cualquier caso, no debemos olvidar que la investigación en este campo nos aporta una valiosísima información no sólo para conocer la interacción parásito-hospedador a la hora de aplicar diferentes estrategias de inmunización, sino que éste mismo conocimiento nos abre vías alternativas de lucha contra la enfermedad. Este es el caso de estrategias de terapia combinada que fusionen el uso de compuestos antimoniales convencionales con agentes leishmaniales inmunoprotectores como podrían ser las histonas de *Leishmania* administradas en su forma genética o mediante CD cargadas con estos Ag.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

1. La infección con 10^6 promastigotes de *L. infantum* en BALB/c constituye un modelo alternativo para el estudio de los aspectos inmunohistológicos asociados a la patología de la LV. La inducción en el hospedador de un desequilibrio esplénico del balance IFN- γ /IL-10 y la dificultad en la maduración de los granulomas hepáticos promovió la cronificación parasitaria tanto en bazo como en hígado.
2. La infección con 10^5 promastigotes de *L. infantum* en BALB/c constituye un modelo alternativo para valorar las cualidades inmunoprotectivas de agentes vacunales frente a LV. La infección cursó de forma gradual alcanzando a los 56 días el establecimiento de una homeostasis inmunitaria esplénica y una maduración granulomatosa en hígado que promueven la persistencia parasitaria en bazo y la esterilidad hepática.
3. La administración de CD-HIS promovió frente a LC una disminución de la lesión dérmica acompañada por una baja carga parasitaria en el sitio de infección primario y una ausencia de visceralización. Sin embargo, se perdió la capacidad para controlar una segunda infección por *L. major*.
4. La administración de CD-HISCpG suscita en el modelo BALB/c un perfil inmunitario de tipo Th1, limita el de tipo Th2 y disminuye la acumulación de células T supresoras en el sitio de infección por *L. major*. Esta estrategia favorece la adquisición de una memoria inmunológica efectiva frente a una segunda infección.
5. La administración de CD-HIS ó -HISCpG induce la disminución de las cargas parasitarias esplénica y hepática frente a LV en un 50 % de los casos, y es dependiente de la acumulación basal de células T supresoras esplénicas implicadas en la adquisición de un equilibrio inmunitario entre las funciones celulares efectora y supresora.
6. La inmunización genética con un cóctel plasmídico que codifica para las cuatro histonas favoreció la adquisición de un control completo de la infección secundaria por *L. major* dependiente de la inducción de un perfil de tipo Th1, de la limitación del perfil de susceptibilidad y de una baja acumulación de células T supresoras en el sitio de infección.
7. Las construcciones genéticas que codifican para las histonas H2AH3, H2BH4, H2AH4 y H2BH3 se expresan en células de mamífero.
8. La inmunización genética con dos histonas confirió en BALB/c un control transitorio de la infección con *L. major* mediado por un perfil inmunitario de tipo mixto, atenuado por la acumulación de células T supresoras en el ganglio poplíteo. Sin embargo, la misma estrategia de inmunización no fue capaz de modificar el perfil de susceptibilidad murina frente a la infección por *L. infantum*.
9. La administración genética multicomponente de las histonas favorece la adquisición de un control inmunitario frente a la infección por *L. major* más eficiente que la inmunización con sólo dos histonas.
10. La estrategia de vacunación con CD cargadas con histonas mejora las propiedades de la inmunización genética frente a las infecciones cutáneas y viscerales por *Leishmania*.

BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L. F. & Jaffe, C. L. (1991). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* **13**, 537-50.
- Ahmed, S., Colmenares, M., Soong, L., Goldsmith-Pestana, K., Munstermann, L., Molina, R. & McMahon-Pratt, D. (2003). Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* **71**, 401-10.
- Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-80.
- Alexander, J. & Bryson, K. (2005). T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* **99**, 17-23.
- Alexander, J. & Russell, D. G. (1992). The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol* **31**, 175-254.
- Alexander, J., Satoskar, A. R. & Russell, D. G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112 Pt 18**, 2993-3002.
- Alvar, J., Molina, R., San Andres, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., Gonzalez, F., San Andres, M. D., Boggio, J., Rodriguez, F. & et al. (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* **88**, 371-8.
- Antoine, J. C., Prina, E., Courret, N. & Lang, T. (2004). *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv Parasitol* **58**, 1-68.
- Ardavin, C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **3**, 582-90.
- Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* **14**, 523-32.
- Awasthi, A., Mathur, R. K. & Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* **119**, 238-58.
- Babiuk, L. A., Babiuk, S. L., Loehr, B. I. & van Drunen Littel-van den, H. (2000a). Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet Immunol Immunopathol* **76**, 1-23.
- Babiuk, L. A., Lewis, J., Suradhat, S., Baca-Estrada, M., Foldvari, M. & Babiuk, S. (1999). Polynucleotide vaccines: potential for inducing immunity in animals. *J Biotechnol* **73**, 131-40.
- Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Loehr, B. I. & Uwiera, R. (2000b). Veterinary applications of DNA vaccines. *Dev Biol (Basel)* **104**, 73-81.
- Bacellar, O., D'Oliveira, A., Jr., Jeronimo, S. & Carvalho, E. M. (2000). IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* **12**, 1228-31.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
- Barratt, G. & Legrand, P. (2005). Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **18**, 527-30.
- Basu, A., Chakrabarti, G., Saha, A. & Bandyopadhyay, S. (2000). Modulation of CD11C+ splenic dendritic cell functions in murine visceral leishmaniasis: correlation with parasite replication in the spleen. *Immunology* **99**, 305-13.
- Belkaid, Y. (2003). The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* **3**, 875-85.

- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G. & Sacks, D. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* **165**, 969-77.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. & Sacks, D. L. (2002a). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**, 502-7.
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C. & Sacks, D. (2002b). CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* **168**, 3992-4000.
- Berberich, C., Ramirez-Pineda, J. R., Hambrecht, C., Alber, G., Skeiky, Y. A. & Moll, H. (2003). Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* **170**, 3171-9.
- Bhattacharya, S. K., Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Junge, K., Karbwang, J., Bryceson, A. D. & Berman, J. D. (2004). Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* **38**, 217-21.
- Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Jhonson, P. L., Bhattacharya, S. K. & Majumdar, S. (2001). Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect Immun* **69**, 1499-507.
- Bonfante-Garrido, R., Urdaneta, I., Urdaneta, R. & Alvarado, J. (1991). Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **85**, 53.
- Borja-Cabrera, G. P., Cruz Mendes, A., Paraguai de Souza, E., Hashimoto Okada, L. Y., de, A. T. F. A., Kawasaki, J. K., Costa, A. C., Reis, A. B., Genaro, O., Batista, L. M., Palatnik, M. & Palatnik-de-Sousa, C. B. (2004). Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* **22**, 2234-43.
- Bottrel, R. L., Dutra, W. O., Martins, F. A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R. P., Mayrink, W., Locksley, R. & Gollob, K. J. (2001). Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* **69**, 3232-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brandonisio, O., Spinelli, R. & Pepe, M. (2004). Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect* **6**, 1402-9.
- Brown, J. A., Greenwald, R. J., Scott, S., Schweitzer, A. N., Satoskar, A. R., Chung, C., Schopf, L. R., van der Woude, D., Sypek, J. P. & Sharpe, A. H. (2002). T helper differentiation in resistant and susceptible B7-deficient mice infected with *Leishmania major*. *Eur J Immunol* **32**, 1764-72.
- Brown, J. A., Titus, R. G., Nabavi, N. & Glimcher, L. H. (1996). Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. *J Infect Dis* **174**, 1303-8.
- Buffet, P. A., Sulahian, A., Garin, Y. J., Nassar, N. & Derouin, F. (1995). Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2167-8.

- Cabral, M., O'Grady, J. E., Gomes, S., Sousa, J. C., Thompson, H. & Alexander, J. (1998). The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* **76**, 173-80.
- Campos-Neto, A., Porrozzzi, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Seiky, Y. A., Reed, S. G. & Grimaldi, G., Jr. (2001). Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun* **69**, 4103-8.
- Carrion, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folgueira, C., Abanades, D. R., Requena, J. M. & Alonso, C. (2006). Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol* **28**, 173-83.
- Carvalho, E. M., Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Barral-Netto, M., Badaro, R., Rocha, H. & Johnson, W. D., Jr. (1992). Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *J Infect Dis* **165**, 535-40.
- Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* **271**, 1251-62.
- Coffman, R. L., Leberman, D. A. & Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* **54**, 229-70.
- Cohen, A. D., Boyer, J. D. & Weiner, D. B. (1998). Modulating the immune response to genetic immunization. *Faseb J* **12**, 1611-26.
- Coler, R. N. & Reed, S. G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* **21**, 244-9.
- Colino, J. & Snapper, C. M. (2003). Dendritic cells, new tools for vaccination. *Microbes Infect* **5**, 311-9.
- Colmenares, M., Corbi, A. L., Turco, S. J. & Rivas, L. (2004). The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol* **172**, 1186-90.
- Condon, C., Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K. & Falo, L. D., Jr. (1996). DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* **2**, 1122-8.
- Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. & Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* **174**, 231-5.
- Cotterell, S. E., Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. (2000). Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **68**, 1840-8.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P. & Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* **123**, 357-88.
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* **72**, 132-41.
- Chang, K. P. & McGwire, B. S. (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis* **1**, 1.
- Chang, K. P., Reed, S. G., McGwire, B. S. & Soong, L. (2003). *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* **85**, 375-90.
- Chenik, M., Louzir, H., Ksontini, H., Dilou, A., Abdmouleh, I. & Dellagi, K. (2006). Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. *Vaccine* **24**, 2521-9.
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. & Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* **186**, 1623-31.

- Dantas-Torres, F. (2006).** Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet Parasitol* **141**, 1-8.
- de Oliveira, C. I., Bafica, A., Oliveira, F., Favali, C. B., Correa, T., Freitas, L. A., Nascimento, E., Costa, J. M. & Barral, A. (2003).** Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **37**, e149-53.
- Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S. J. & Beverley, S. M. (1995).** A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* **269**, 1869-72.
- Dondji, B., Perez-Jimenez, E., Goldsmith-Pestana, K., Esteban, M. & McMahon-Pratt, D. (2005).** Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* **73**, 5286-9.
- Doria-Rose, N. A. & Haigwood, N. L. (2003).** DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods* **31**, 207-16.
- Elloso, M. M. & Scott, P. (1999).** Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J Immunol* **162**, 6708-15.
- Engwerda, C. R., Ato, M. & Kaye, P. M. (2004).** Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* **20**, 524-30.
- Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. (2000).** Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* **21**, 73-8.
- Evans, T. G., Smith, D. & Pearson, R. D. (1990).** Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *J Parasitol* **76**, 212-7.
- Ferrer, L., Aisa, M. J., Roura, X. & Portus, M. (1995).** Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec* **136**, 514-6.
- Fissore, C., Delaunay, P., Ferrua, B., Rosenthal, E., Del Giudice, P., Aufeuvre, J. P., Le Fichoux, Y. & Marty, P. (2004).** Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* **42**, 5332-3.
- Flohe, S. B., Bauer, C., Flohe, S. & Moll, H. (1998).** Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *Eur J Immunol* **28**, 3800-11.
- Galanti, N., Galindo, M., Sabaj, V., Espinoza, I. & Toro, G. C. (1998).** Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today* **14**, 64-70.
- Garcia-Alonso, M., Nieto, C. G., Blanco, A., Requena, J. M., Alonso, C. & Navarrete, I. (1996).** Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol* **18**, 539-46.
- Gomes-Pereira, S., Rodrigues, O. R., Rolao, N., Almeida, P. D. & Santos-Gomes, G. M. (2004a).** Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8⁺ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**, 59-68.
- Gomes-Pereira, S., Rodrigues, O. R. & Santos-Gomes, G. M. (2004b).** Dynamics of CD62L/CD45RB CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett* **95**, 63-70.
- Gomes, D. C., Pinto, E. F., Melo, L. D., Lima, W. P., Larraga, V., Lopes, U. G. & Rossi-Bergmann, B. (2006).** Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine*.
- Gonzalo, R. M., del Real, G., Rodriguez, J. R., Rodriguez, D., Heljasvaara, R., Lucas, P., Larraga, V. & Esteban, M. (2002).** A heterologous prime-boost regime using DNA and

- recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **20**, 1226-31.
- Gordon, S. (2002).** Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927-30.
- Goto, H. & Lindoso, J. A. (2004).** Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* **37**, 615-23.
- Gradoni, L. (2001).** An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* **100**, 87-103.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005).** The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* **35**, 1169-80.
- Gregersen, J. P. (2001).** DNA vaccines. *Naturwissenschaften* **88**, 504-13.
- Gumy, A., Louis, J. A. & Launois, P. (2004).** The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* **34**, 433-44.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M. & Seder, R. A. (2000).** DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* **18**, 927-74.
- Gurunathan, S., Sacks, D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., Charest, H., Glaichenhaus, N. & Seder, R. A. (1997).** Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* **186**, 1137-47.
- Hall, L. R. & Titus, R. G. (1995).** Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* **155**, 3501-6.
- Handman, E. (1999).** Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* **44**, 1-39.
- Handman, E. (2001).** Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* **14**, 229-43.
- Handman, E., Noormohammadi, A. H., Curtis, J. M., Baldwin, T. & Sjolander, A. (2000).** Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine* **18**, 3011-7.
- Hartmann, G., Weiner, G. J. & Krieg, A. M. (1999).** CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9305-10.
- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Mutha, S. S. & Locksley, R. M. (1991).** Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7011-5.
- Himmelrich, H., Launois, P., Maillard, I., Biedermann, T., Tacchini-Cottier, F., Locksley, R. M., Rocken, M. & Louis, J. A. (2000).** In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol* **164**, 4819-25.
- Hommel, M., Jaffe, C. L., Travi, B. & Milon, G. (1995).** Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* **89 Suppl 1**, 55-73.
- Iborra, S., Carrion, J., Anderson, C., Alonso, C., Sacks, D. & Soto, M. (2005).** Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun* **73**, 5842-52.
- Iborra, S., Soto, M., Carrion, J., Alonso, C. & Requena, J. M. (2004).** Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **22**, 3865-76.

- Iborra, S., Soto, M., Carrion, J., Nieto, A., Fernandez, E., Alonso, C. & Requena, J. M. (2003). The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun* **71**, 6562-72.
- Iniesta, V., Carcelen, J., Molano, I., Peixoto, P. M., Redondo, E., Parra, P., Mangas, M., Monroy, I., Campo, M. L., Nieto, C. G. & Corraliza, I. (2005). Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun* **73**, 6085-90.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C. & Corraliza, I. (2001). The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* **193**, 777-84.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C., Molano, I., Mohedano, A., Carcelen, J., Miron, C., Alonso, C. & Corraliza, I. (2002). Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* **24**, 113-8.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 3388-93.
- Julia, V., Rassoulzadegan, M. & Glaichenhaus, N. (1996). Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* **274**, 421-3.
- Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* **2**, 1765-73.
- Kaye, P. (2000). Granulomatous diseases. *Int J Exp Pathol* **81**, 289-90.
- Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S. & Engwerda, C. R. (2004). The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* **201**, 239-53.
- Kropf, P., Freudenberg, M. A., Modolell, M., Price, H. P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D. F. & Muller, I. (2004). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* **72**, 1920-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W. & Laskay, T. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* **70**, 826-35.
- Launois, P., Maillard, I., Pingel, S., Swihart, K. G., Xenarios, I., Acha-Orbea, H., Diggelmann, H., Locksley, R. M., MacDonald, H. R. & Louis, J. A. (1997). IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* **6**, 541-9.
- Lehmann, J., Enssle, K. H., Lehmann, I., Emmendorfer, A. & Lohmann-Matthes, M. L. (2000). The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 63-77.
- Lima-Netto, C. d. (1999). *Leishmaniosis canina*, Editorial Tika edn (Barcelona).
- Lima, G. M., Vallochi, A. L., Silva, U. R., Bevilacqua, E. M., Kiffer, M. M. & Abrahamsohn, I. A. (1998). The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* **64**, 145-51.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-60.

- Maldonado, R. A., Irvine, D. J., Schreiber, R. & Glimcher, L. H. (2004).** A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* **431**, 527-32.
- Martin-Sanchez, J., Acedo, C., Munoz-Perez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Marquez, F. (2006).** Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol.*
- Masina, S., M. M. G., Demotz, S. O. & Fasel, N. J. (2003).** Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *J Infect Dis* **188**, 1250-7.
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A. & Lukes, J. (2001).** Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**, 397-402.
- Melby, P. C. (2002).** Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. *Am J Clin Dermatol* **3**, 557-70.
- Melby, P. C., Chandrasekar, B., Zhao, W. & Coe, J. E. (2001a).** The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* **166**, 1912-20.
- Melby, P. C., Ogden, G. B., Flores, H. A., Zhao, W., Geldmacher, C., Biediger, N. M., Ahuja, S. K., Uranga, J. & Melendez, M. (2000).** Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* **68**, 5595-602.
- Melby, P. C., Tabares, A., Restrepo, B. I., Cardona, A. E., McGuff, H. S. & Teale, J. M. (2001b).** *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* **99**, 17-25.
- Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E. & Cheng, J. (2001c).** *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* **69**, 4719-25.
- Melby, P. C., Yang, Y. Z., Cheng, J. & Zhao, W. (1998).** Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **66**, 18-27.
- Mendez, S., Belkaid, Y., Seder, R. A. & Sacks, D. (2002).** Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **20**, 3702-8.
- Mendez, S., Gurunathan, S., Kamhawi, S., Belkaid, Y., Moga, M. A., Skeiky, Y. A., Campos-Neto, A., Reed, S., Seder, R. A. & Sacks, D. (2001).** The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol* **166**, 5122-8.
- Mendez, S., Reckling, S. K., Piccirillo, C. A., Sacks, D. & Belkaid, Y. (2004).** Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* **200**, 201-10.
- Modabber, F. (1995).** Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* **89 Suppl 1**, 83-8.
- Mohrs, M., Holscher, C. & Brombacher, F. (2000).** Interleukin-4 receptor alpha-deficient BALB/c mice show an unimpaired T helper 2 polarization in response to *Leishmania major* infection. *Infect Immun* **68**, 1773-80.
- Molano, I., Alonso, M. G., Miron, C., Redondo, E., Requena, J. M., Soto, M., Nieto, C. G. & Alonso, C. (2003).** A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* **92**, 1-13.
- Momen, H. & Cupolillo, E. (2000).** Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**, 583-8.

- Moreira, D., Lopez-Garcia, P. & Vickerman, K. (2004).** An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1861-75.
- Moreno, J. (2007).** Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* **23**, 86-8.
- Morris, R. V., Shoemaker, C. B., David, J. R., Lanzaro, G. C. & Titus, R. G. (2001).** Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* **167**, 5226-30.
- Mukherjee, P., Ghosh, A. K. & Ghose, A. C. (2003).** Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. *Immunol Lett* **86**, 131-8.
- Murphy, M. L., Engwerda, C. R., Gorak, P. M. & Kaye, P. M. (1997).** B7-2 blockade enhances T cell responses to *Leishmania donovani*. *J Immunol* **159**, 4460-6.
- Murphy, M. L., Wille, U., Villegas, E. N., Hunter, C. A. & Farrell, J. P. (2001).** IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* **31**, 2848-56.
- Murray, H. W. (2000).** Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and -independent regulation. *Infect Immun* **68**, 6294-9.
- Murray, H. W. (2001).** Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* **82**, 249-67.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. & Saravia, N. G. (2005).** Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**, 1561-77.
- Murray, H. W., Squires, K. E., Miralles, C. D., Stoeckle, M. Y., Granger, A. M., Granelli-Piperno, A. & Bogdan, C. (1992).** Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J Immunol* **148**, 1858-63.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. & Mantovani, A. (2000).** Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**, 5998-6004.
- Nieto, C. G., Garcia-Alonso, M., Requena, J. M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C. & Navarrete, I. (1999).** Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* **67**, 117-30.
- Noel, W., Raes, G., Hassanzadeh Ghassabeh, G., De Baetselier, P. & Beschin, A. (2004).** Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* **20**, 126-33.
- Nogueira, F. S., Moreira, M. A., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Menz, I., Parra, L. E., Xu, Z., Chu, H. J., Palatnik-de-Sousa, C. B. & Luvizotto, M. C. (2005).** Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* **23**, 4805-10.
- Noormohammadi, A. H., Hochrein, H., Curtis, J. M., Baldwin, T. M. & Handman, E. (2001).** Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen. *Vaccine* **19**, 4043-52.
- Oliveira, J. G., Novais, F. O., de Oliveira, C. I., da Cruz Junior, A. C., Campos, L. F., da Rocha, A. V., Boaventura, V., Noronha, A., Costa, J. M. & Barral, A. (2005).** Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* **94**, 55-9.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Breton, M., Kundig, C., Dumas, C., Fillion, I., Singh, A. K., Olivier, M. & Ouellette, M. (2002).** Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* biopterin

transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun* **70**, 62-8.

Papageorgiou, F. T. & Soteriadou, K. P. (2002). Expression of a novel *Leishmania* gene encoding a histone H1-like protein in *Leishmania major* modulates parasite infectivity in vitro. *Infect Immun* **70**, 6976-86.

Parra, L. E., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Souza, L. O., Palatnik-de-Sousa, C. B. & Menz, I. (2006). Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*.

Perez-Jimenez, E., Kochan, G., Gherardi, M. M. & Esteban, M. (2006). MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes Infect* **8**, 810-22.

Peters, N. & Sacks, D. (2006). Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* **213**, 159-79.

Pinto, E. F., Pinheiro, R. O., Rayol, A., Larraga, V. & Rossi-Bergmann, B. (2004). Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infect Immun* **72**, 4521-7.

Porgador, A., Irvine, K. R., Iwasaki, A., Barber, B. H., Restifo, N. P. & Germain, R. N. (1998). Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* **188**, 1075-82.

Probst, P., Stromberg, E., Ghalib, H. W., Mozel, M., Badaro, R., Reed, S. G. & Webb, J. R. (2001). Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol* **166**, 498-505.

Pulendran, B. (2004). Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Rev* **199**, 227-50.

Rafati, S., Kariminia, A., Seyde-Eslami, S., Narimani, M., Taheri, T. & Lebbatard, M. (2002). Recombinant cysteine proteinases-based vaccines against *Leishmania major* in BALB/c mice: the partial protection relies on interferon gamma producing CD8(+) T lymphocyte activation. *Vaccine* **20**, 2439-47.

Rafati, S., Salmanian, A. H., Taheri, T., Vafa, M. & Fasel, N. (2001). A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine* **19**, 3369-75.

Ramirez-Pineda, J. R., Frohlich, A., Berberich, C. & Moll, H. (2004). Dendritic cells (DC) activated by CpG DNA ex vivo are potent inducers of host resistance to an intracellular pathogen that is independent of IL-12 derived from the immunizing DC. *J Immunol* **172**, 6281-9.

Ramirez, J. R., Gilchrist, K., Robledo, S., Sepulveda, J. C., Moll, H., Soldati, D. & Berberich, C. (2001). Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine* **20**, 455-61.

Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A. & Larraga, V. (2003). Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* **21**, 2474-84.

Ramos, A., Portero, J. L., Gazapo, T., Yebra, M., Portero, F. & Martin, T. (1998). [Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients]. *An Med Interna* **15**, 301-4.

Ramsay, A. J., Ramshaw, I. A. & Ada, G. L. (1997). DNA immunization. *Immunol Cell Biol* **75**, 360-3.

Requena, J. M., Alonso, C. & Soto, M. (2000a). Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* **16**, 246-50.

- Requena, J. M., Iborra, S., Carrion, J., Alonso, C. & Soto, M. (2004). Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther* 4, 1505-17.
- Requena, J. M., Soto, M., Doria, M. D. & Alonso, C. (2000b). Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76, 269-81.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Guessous-Idrissi, N., Lasri, S., Natami, A., Riyad, M. & Berrag, B. (1999). Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 81, 173-84.
- Rhee, E. G., Mendez, S., Shah, J. A., Wu, C. Y., Kirman, J. R., Turon, T. N., Davey, D. F., Davis, H., Klinman, D. M., Coler, R. N., Sacks, D. L. & Seder, R. A. (2002). Vaccination with heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 195, 1565-73.
- Rhodes, S. G. & Graham, S. P. (2002). Is 'timing' important for cytokine polarization? *Trends Immunol* 23, 246-9.
- Rica-Capela, M. J., Cortes, S., Leandro, C., Peleteiro, M. C., Santos-Gomes, G. & Campino, L. (2003). Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res* 89, 163-9.
- Roberts, S. C., Tancer, M. J., Polinsky, M. R., Gibson, K. M., Heby, O. & Ullman, B. (2004). Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem* 279, 23668-78.
- Rolao, N., Melo, C. & Campino, L. (2004). Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Trop* 90, 123-6.
- Ross, G. D. (2000). Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* 20, 197-222.
- Rousseau, D., Demartino, S., Ferrua, B., Michiels, J. F., Anjuere, F., Fragaki, K., Le Fichoux, Y. & Kubar, J. (2001). In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol* 1, 17.
- Sacks, D. & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55, 453-83.
- Sacks, D. & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 845-58.
- Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 69, 100-3.
- Sacks, D. L., Hieny, S. & Sher, A. (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol* 135, 564-9.
- Sacks, D. L. & Perkins, P. V. (1985). Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 34, 456-9.
- Saldarriaga, O. A., Travi, B. L., Park, W., Perez, L. E. & Melby, P. C. (2006). Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24, 1928-40.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.).
- Saraiva, E. M., de Figueiredo Barbosa, A., Santos, F. N., Borja-Cabrera, G. P., Nico, D., Souza, L. O., de Oliveira Mendes-Aguiar, C., de Souza, E. P., Fampa, P., Parra, L. E., Menz, I., Dias, J. G., Jr., de Oliveira, S. M. & Palatnik-de-Sousa, C. B. (2006). The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine* 24, 2423-31.

- Satoskar, A. R., Stamm, L. M., Zhang, X., Satoskar, A. A., Okano, M., Terhorst, C., David, J. R. & Wang, B. (1999). Mice lacking NK cells develop an efficient Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. *J Immunol* **162**, 6747-54.
- Scott, P. (1993). IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* **260**, 496-7.
- Scott, P. & Hunter, C. A. (2002). Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol* **14**, 466-70.
- Scott, P., Pearce, E., Natovitz, P. & Sher, A. (1987). Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *J Immunol* **139**, 221-7.
- Shah, J. A., Darrah, P. A., Ambrozak, D. R., Turon, T. N., Mendez, S., Kirman, J., Wu, C. Y., Glaichenhaus, N. & Seder, R. A. (2003). Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* **198**, 281-91.
- Sharifi, I., FeKri, A. R., Aflatonian, M. R., Khamesipour, A., Nadim, A., Mousavi, M. R., Momeni, A. Z., Dowlati, Y., Godal, T., Zicker, F., Smith, P. G. & Modabber, F. (1998). Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* **351**, 1540-3.
- Shi, P. Y., Maizels, N. & Weiner, A. M. (1997). Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies. *Biotechniques* **23**, 1036-8.
- Shibata, Y., Foster, L. A., Kurimoto, M., Okamura, H., Nakamura, R. M., Kawajiri, K., Justice, J. P., Van Scott, M. R., Myrvik, Q. N. & Metzger, W. J. (1998). Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J Immunol* **161**, 4283-8.
- Skeiky, Y. A., Coler, R. N., Brannon, M., Stromberg, E., Greeson, K., Crane, R. T., Webb, J. R., Campos-Neto, A. & Reed, S. G. (2002). Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine* **20**, 3292-303.
- Skeiky, Y. A., Kennedy, M., Kaufman, D., Borges, M. M., Guderian, J. A., Scholler, J. K., Ovendale, P. J., Picha, K. S., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Campos-Neto, A. & Reed, S. G. (1998). LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* **161**, 6171-9.
- Smelt, S. C., Cotterell, S. E., Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. (2000). B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* **164**, 3681-8.
- Smelt, S. C., Engwerda, C. R., McCrossen, M. & Kaye, P. M. (1997). Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol* **158**, 3813-21.
- Smirlis, D., Bisti, S. N., Xingi, E., Konidou, G., Thiakaki, M. & Soteriadou, K. P. (2006). *Leishmania* histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces *Leishmania* infectivity in vivo. *Mol Microbiol* **60**, 1457-73.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J. E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M. & Portus, M. (2001). *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* **96**, 265-76.
- Solioz, N., Blum-Tirouvanziam, U., Jacquet, R., Rafati, S., Corradin, G., Mauel, J. & Fasel, N. (1999). The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **18**, 850-9.

- Soto, M., Quijada, L., Alonso, C. & Requena, J. M. (1997). Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol* **90**, 439-47.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L. & Alonso, C. (1996a). Organization, transcription and regulation of the *Leishmania infantum* histone H3 genes. *Biochem J* **318** (Pt 3), 813-9.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L. & Alonso, C. (1998). Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* **36**, 58-63.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Garcia, M., Guzman, F., Patarroyo, M. E. & Alonso, C. (1995). Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* **48**, 209-14.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Gomez, L. C., Guzman, F., Patarroyo, M. E. & Alonso, C. (1996b). Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* **106**, 454-61.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Perez, M. J., Nieto, C. G., Guzman, F., Patarroyo, M. E. & Alonso, C. (1999). Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* **115**, 342-9.
- Stacey, K. J. & Blackwell, J. M. (1999). Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. *Infect Immun* **67**, 3719-26.
- Stager, S., Alexander, J., Carter, K. C., Brombacher, F. & Kaye, P. M. (2003). Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun* **71**, 4804-7.
- Stanley, A. C. & Engwerda, C. R. (2006). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*.
- Stober, C. B., Lange, U. G., Roberts, M. T., Alcamí, A. & Blackwell, J. M. (2005). IL-10 from regulatory T cells determines vaccine efficacy in murine *Leishmania major* infection. *J Immunol* **175**, 2517-24.
- Stobie, L., Gurunathan, S., Prussin, C., Sacks, D. L., Glaichenhaus, N., Wu, C. Y. & Seder, R. A. (2000). The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8427-32.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5.
- Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G. & Belkaid, Y. (2005). A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* **174**, 5444-55.
- Suffia, I. J., Reckling, S. K., Piccirillo, C. A., Goldszmid, R. S. & Belkaid, Y. (2006). Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* **203**, 777-88.
- Sullivan, W. J., Jr., Naguleswaran, A. & Angel, S. O. (2006). Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol*.
- Sundar, S. & Benjamin, B. (2003). Diagnosis and treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Assoc Physicians India* **51**, 195-201.
- Sundar, S. & Rai, M. (2005). Treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* **6**, 2821-9.
- Tabbara, K. S., Peters, N. C., Afrin, F., Mendez, S., Bertholet, S., Belkaid, Y. & Sacks, D. L. (2005). Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection. *Infect Immun* **73**, 4714-22.
- Taubes, G. (1997). Salvation in a snippet of DNA? *Science* **278**, 1711-4.

- Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M. & Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22, 32-40.
- Titus, R. G., Gueiros-Filho, F. J., de Freitas, L. A. & Beverley, S. M. (1995). Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10267-71.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Rowton, E. & Ribeiro, J. M. (2001). The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol* 204, 229-37.
- van Gisbergen, K. P., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. (2005). Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* 26, 626-31.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. & Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173, 6521-5.
- Vega-Lopez, F. (2003). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 16, 97-101.
- Vexenat, J. A., de Castro, J. A., Cavalcante, R., Tavares, J. P., da Silva, M. R., Batista, W. H., Campos, J. H., Howard, M. K., Frame, I., McNerney, R. & et al. (1994). Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89, 131-5.
- Vinuelas, J., Garcia-Alonso, M., Ferrando, L., Navarrete, I., Molano, I., Miron, C., Carcelen, J., Alonso, C. & Nieto, C. G. (2001). Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 101, 23-7.
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Nguyen, B. V., Cushing, M., Sacks, D. L. & Udey, M. C. (2000). *Leishmania major*-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis. *Eur J Immunol* 30, 3498-506.
- Von Stebut, E., Ehrchen, J. M., Belkaid, Y., Kostka, S. L., Molle, K., Knop, J., Sunderkotter, C. & Udey, M. C. (2003). Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med* 198, 191-9.
- von Stebut, E. & Udey, M. C. (2004). Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 6, 1102-9.
- Walker, P. S., Scharton-Kersten, T., Krieg, A. M., Love-Homan, L., Rowton, E. D., Udey, M. C. & Vogel, J. C. (1999). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6970-5.
- Walker, P. S., Scharton-Kersten, T., Rowton, E. D., Hengge, U., Boulloc, A., Udey, M. C. & Vogel, J. C. (1998). Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther* 9, 1899-907.
- Wilson, M. E., Jeronimo, S. M. & Pearson, R. D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 38, 147-60.
- Wilson, M. E. & Weinstock, J. V. (1996). Hepatic Granulomas in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania chagasi*. *Methods* 9, 248-54.
- Wing, K., Suri-Payer, E. & Rudin, A. (2005). CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* 62, 1-15.
- Wolffe, A. P. & Hayes, J. J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27, 711-20.

- Wu, W., Weigand, L., Belkaid, Y. & Mendez, S. (2006).** Immunomodulatory effects associated with a live vaccine against *Leishmania major* containing CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* **36**, 3238-47.
- Xu, D. & Liew, F. Y. (1995).** Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology* **84**, 173-6.
- Zadeh-Vakili, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Doustdari, F., Salmanian, A. H. & Rafati, S. (2004).** Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania major* cysteine proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis. *Vaccine* **22**, 1930-40.
- Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H. & Heeg, K. (1998).** CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* **160**, 3627-30.

ANEXO PUBLICACIONES



8. ANEXO

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Carrión, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folgueira, C., Abanades, D., Requena, J.M. & Alonso, C. (2006). Immunohistological features of visceral leishmaniosis in BALB/c mice. *Parasite immunology* **28**, 173-183.

Carrión, J., Nieto, A., Soto, M. & Alonso, C. (2007). Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniosis in BALB/c mice. *Microbes and infection* in press. (doi:10.1016/j.micinf.2007.02.018).

OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA ACTIVIDAD DE ESTA TESIS DOCTORAL

Iborra, S., Soto, M., **Carrión, J.**, Nieto, A., Fernández, E., Alonso, C. & Requena J.M. (2003). The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infection & Immunity* **71**, 6562-72.

Iborra, S., Soto, M., **Carrión, J.**, Alonso, C. & Requena J.M. (2004). Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniosis. *Vaccine* **22**, 3865-76.

Requena J.M., Iborra, S., **Carrión, J.**, Alonso, C. & Soto, M. (2004). Recent advances in vaccines for leishmaniosis. *Expert Opin. Biol. Ther* **4**, 1505-1517.

Iborra, S., **Carrión, J.**, Anderson, C., Alonso, C. Sacks, D. & Soto, M. (2005). Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CPG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniosis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infection & Immunity* **73**, 5842-52.

Nguewa P., Fuertes, M., Cepeda, V., Iborra, S., **Carrión, J.**, Valladares, B., Alonso, C. & Pérez, J.M. (2005). Pentamidine: an apoptotic drug against the protozoan parasite *Leishmania infantum*, which selectively modifies ubiquitin structure. *Chemistry & Biodiversity* **2**, 1387-1400.

Gironés, N., Bueno, J.L., **Carrión, J.**, Fresno, M. & Castro, E. (2006). The efficacy of photochemical treatment with methylene blue and light for the reduction of *Trypanosoma cruzi* in infected plasma. *Vox sanguinis* **91**, 285-291.

Castro, E., Gironés, N., Bueno, J.L., **Carrión, J.**, Lin, L. & Fresno, M. (2007). The efficacy of photochemical treatment with amotosalen HCL and UVA (intercept) for inactivation of *Trypanosoma cruzi* in pooled buffy-coat platelets. *Transfusion* **47**, 434-41.